Série A, N° 4461
N° d'ordre : 5309

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Albert SAMSO

1re THESE. — *« Recherches expérimentales sur le Sarcome de Sticker ».*

2e THESE. — *Propositions données par la Faculté.*

Soutenues le 26 MAI 1965 devant la commission d'examen.

MM. THOMAS *Président.*
SOULAIRAC, HOLLANDE *Examinateurs.*
LEPINE *Invité.*

Série A, N° 4461
N° d'ordre : 5309

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Albert SAMSO

1re **THESE.** — *« Recherches expérimentales sur le Sarcome de Sticker ».*

2e **THESE.** — *Propositions données par la Faculté.*

Soutenues le **devant la commission d'examen.**

MM. THOMAS *Président.*
SOULAIRAC, HOLLANDE *Examinateurs.*
LEPINE *Invité.*

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

7 JANVIER 1965

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY

BRELOT	T	Analyse supérieure
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparée
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Minéralogie et cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique ENS
CARTAN	T	Mathématiques ENS
LAFFITTE	T	Chimie générale
N...	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du globe
COUSIN (Mlle)	T	Biologie animale SPCN
CHRETIEN	T	Chimie minérale
BOCQUET	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique ENS
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie SPCN et sédiment (Orsay)
GAUTHERET	T	Biologie végétale PCB
LUCAS (R.)	T	Recherches physiques
THOMAS (A.)	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET	T	Physique PCB
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DRACH	T	Zoologie
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie végétale SPCN
CAUCHOIS (Mlle)	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du globe
L'HERITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DU BREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Géologie

TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électrique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurelle
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théorie physique
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et cristallographie
MATHIEU (J.-P.)	T	Physique optique
COUTEAUX	T	Cytologie
MAY	T	Zoologie
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématiques
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (technique aéronautique)
NORMANT	T	Synthèse organique
BENARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique ENS
DUGUE	T	Statistique mathématique
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée
MARECHAL	T	Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
LE BRETON (Mlle)	T	Physiologie de la nutrition
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANCON	T	Physique SPCN
GLANGEAUD	T	Géographie physique et géologique
DODEMENT	T	Mathématiques MGP
PISOT	T	Technique mathématique de la physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMANN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Géologie générale
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique MGP
RIZET	T	Génétique (Orsay)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
TONNELAT (Mme)	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques MPC
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie systématique
LEVY (M.)	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
CHAIX (Mme)	T	Chimie biologique
HUREL PY (Mme)	T	Biologie végétale PCB
PANNETIER	T	Chimie générale
BRUN	T	Mécanique des fluides I
LEDERER	T	Chimie biologique (Orsay)
DUBREIL (Mme)	T	Mathématiques (agrégation)
LELONG (Mme)	T	Mathématiques II ENS
BELLAIR	T	Géologie SPCN
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS (J.-E.)	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie ENS
MICHEL (A.)	T	Chimie minérale (Orsay)

OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie végétale
CASTAING	T	Physique II thermodynamique (Orsay)
CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay)
CHARNIAUX-COTTON (Mme)	T	Evolution des êtres organisés
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie quantique
TEILLAC	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
TONNELAT	T	Biologie physico chimique (Orsay)
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie PCB
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches physiques
GUINOCHET	T	Biologie végétale SPCN (Orsay)
ROLLET	T	Chimie minérale
JOSIEN (Mlle)	T	Chimie SPCN
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay)
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales (Orsay)
BRICARD	T	Météorologie et physique de l'atmosphère
ALBE FESSART (Mme)	T	Psycho-physiologie
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay)
JULIA (M.)	T	Etude des moléculaires complexes
LENDER	T	Biologie animale SPCN (Orsay)
MAGAT	T	Physico chimie des radio-éléments
QUINTIN (Mlle)	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay)
DE POSEEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
LEMEE	T	Ecologie végétale (Orsay)
GUERIN	T	Chimie MPC (Orsay)
CHATELET	T	Chimie PCB
JEAN	T	Physiologie nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique SPCN
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay)
BERTEIN	T	Electronique (Orsay)
BOUISSIERES	T	Radiochimie
COUTURE (Mme)	T	Thermodynamique et mécanique physique
ELLEMBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
FRANC	T	Biologie animale PCB
SCHNELL		Botanique tropicale
STLKOWSKI	T	Physiologie végétale
ACHER	T	Chimie biologique
BAUDOIN	T	Biologie animale PCB
BEAUMONT		Biologie animale SPCN
BLAMONT		Géophsysique ionosphère
BOUREAU	T	Botanique

CURIE (D.)		Physique MGP
DURAND DELGA	T	Géologie
FREON	T	Chimie organique (Orsay)
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des probabilités
CAILLEUX	T	Géologie SPCN
MAGNAN		Physique électricité
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire
FOURCROY (Mlle)		Biologie végétale PCB
CHOQUET BRUHAT (Mme)		Mécanique analytique et mécanique céleste
VEIL (Mlle)	T	Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
BROCHARD	T	Physique PCB (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématique I (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
CAIRE		Géographie physique et géographie dynamique
COMOLET		Mécanique des fluides
CORABŒUF	T	Physiologie animale (Orsay)
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie animale PCB
MALGRANGE		Chimie SPCN (Orsay)
CHEVAUGEON	T	Technique mathématique de la Physique (Orsay)
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE	T	Physique ENS (Orsay)
JULLIEN (J.)	T	Botanique (Orsay)
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T	Mathématiques ENS féminines
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay)
THIRY	T	Mécanique céleste
ABELES		Physique SPCN
AMAT	T	Physique PCB
AUBOIN	T	Géologie
BENOIT-GUEUTAL (Mme)	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
BRUHAT	T	Mathématiques MPC
BRUNN	T	Géologie historique (Orsay)
CHABBAL	T	Physique MGP (Orsay)
DEHEUVELS	T	Mathématiques propédeutique
D'ESPAGNAT	T	Physique théorique (Orsay)
FURON	T	Géologie SPCN
GANS (Mme)	T	Génétique
GENEVES		Biologie animale PCB
GUILBERT		Physique CUS (Orléans)
HUPE	T	Pétrographie
HOLLANDE	T	Biologie générale
LIONS	T	Analyse numérique
MAITTE	T	Chimie PCB
MEYER	T	Physique propédeutique
NICOLAS		Géologie appliquée
PANIGEL		Biologie générale
RAVIER		Pétrographie
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
ROUBINE		Electronique
SILBER	T	Chimie PCB

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0017

UEBERSFELD	T	Electronique
YVON	T	Théories physiques
HERVE	T	Mathématiques
NERON	T	Mathématiques MPC (Orsay)
PECKER WIMEL (Mme)	T	Astrophysique
BALKANSKY		Physique MPC
LE CORRE	T	Electricité
DELCROIX	T	Physique théorique (Orsay)
GOURDIN		Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
LEHMANN	T	Physique expérimental des hautes énergies
NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
ECHALIER		Biologie animale PCB
BARRAUD		Physiologie cellulaire
LIORET		Physiologie végétale (Orsay)
DARS		Géologie structurale et géologie appliquée
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation)
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle
BLAQUIERE		Electronique (Orsay)
ARNOUS	T	Physique théorique
TATIBOUET		Chimie (CSU Orléans)
MALLIEVIN	T	Mathématiques propédeutique (Orsay)
GAUDEMAR		Chimie propédeutique
PEREZ Y JORBA		Physique expérimentale des hautes énergies (Orsay)
DAVID	T	Chimie (agrégation d'Orsay)
BROUSSE	T	Mécanique théorique
ROSCH	T	Astronomie
GUY	T	Physique expérimentale
LAZARD		Mathématiques MPC
MOREL (P.)		Physique MPC
ARSAC		Programmation
LEFEBVRE		Chimie MPC
CHAPEVILLE		Biochimie
BENOIT		Physique CPEM
RIO		Chimie CPEM
JAUZEIN		Géologie ENS
PREVOST (G.)		BV CPEM
FAVARD (P.)		BA CPEM
VILKAS		Chimie CPEM
FICINI (Mlle)		Chimie CPEM
LEQUEUX		Astronomie
COHEN TANNOUDJI		Physique CPEM
TAVERNIER		Physique CPEM
ROIZEN (Mme)		BA SPCN
DURAND (M.)		BA CPEN
PASCAUD		Physiologie
PETIT (Mme)		BA CPEN
BROUSSE		Géologie (Orsay)
CAGNIAC		Physique agrégation (Orsay)
LEBERRE		Zoologie (Orsay)
SCHEFFER		Microbiologie (Orsay)
DE GENNES		Physique des solides (Orsay)
RIOU		Physique nucléaire expérimentale (Orsay)
CLAUSER		Chimie biologique (Orsay)
CHEVALIER		Physiologie animale (Orsay)
JANCOVICI		Physique atomique (Orsay)
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire (Orsay)
FETIZON		Chimie propédeutique (Orsay)
CERF		Mathématiques (Orsay)

LE SECRETAIRE GENERAL
R. POULAIN

A MA MERE

en témoignage de ma profonde affection.

A TOUS LES MIENS

qui sont restés ensevelis en Algérie, ma terre natale.

A M. le Professeur Pierre LEPINE,
Chef de Service à l'Institut Pasteur,
Membre de l'Institut,
Membre de l'Académie de Médecine

qui a orienté nos recherches, puis nous a recueilli dans son laboratoire et nous a permis d'achever ce travail. En témoignage de respectueux et profond attachement.

A M. le Professeur J.-André THOMAS,
Professeur à la Faculté des Sciences,
Membre de l'Académie de Médecine

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette Thèse. En hommage respectueux.

A M. le Professeur André SOULAIRAC,
Professeur à la Faculté des Sciences,

qui a bien voulu accepter de faire partie de notre Jury, avec toute notre reconnaissance.

A M. le Professeur André HOLLANDE,
Professeur à la Faculté des Sciences

En témoignage de gratitude pour l'accueil amical qu'il nous a toujours réservé.

A TOUS MES AMIS

du Centre Algérien de Lutte contre le Cancer
de l'Institut Pasteur d'Algérie,
de l'Institut Pasteur.

SOMMAIRE

INTRODUCTION ET HISTORIQUE GENERAL

1. Définition 1
2. Synonymie 1
3. Historique de l'affection 1
4. Répartition géographique 4
5. Etude clinique 5
6. Anatomie pathologique 8
7. Caractère contagieux de la maladie 9
8. Le problème du sarcome de Sticker 11

CHAPITRE I : RECHERCHES SUR LA GREFFE DU SARCOME DE STICKER

A. — LA GREFFE DU SARCOME DE STICKER CHEZ LE CHIEN

I. — GENERALITES SUR LES GREFFES DE CANCER CHEZ LE CHIEN 13
II. — TRAVAUX ANTERIEURS 14
III. — TRAVAUX PERSONNELS : Obtention de souches 17

a) Matériel et Méthode 18
b) Résultats 19
1) Comportement des greffons sous-cutanés 19
2) Résultats numériques des greffes sous-cutanées 19
3) Rechutes et régressions 21
4) Métastases 22
5) Greffes des métastases 23
6) Greffes intrapéritonéales 24
c) Discussion 26

B. — TRANSMISSION EXPERIMENTALE DU SARCOME DE STICKER DU CHIEN AU CHACAL

a) Matériel et Méthode 27
b) Résultats 28
c) Discussion 30

C. — LA GREFFE HETEROLOGUE DU SARCOME DE STICKER

I. — TRAVAUX ANTERIEURS 31

II. — TRAVAUX PERSONNELS 32
a) Matériel et Méthode 32
b) Résultats 33
c) Discussion 34

CHAPITRE II : **CULTURE « in vitro » DU SARCOME DE STICKER**

A. — LA CULTURE « in vitro » PROPREMENT DITE

I. — TRAVAUX ANTERIEURS 39
II. — TRAVAUX PERSONNELS 40
a) Matériel et Méthode 40
b) Résultats 42
1) Tableaux 43
2) Développement des cultures 46
3) La souche 503 47
Développement de la culture 48
Entretien 48
Taux de croissance 48
Conservation 49
Morphologie des cellules en culture 49
Athrocytose - phagocytose 51
c) Discussion 51

B. — INTERET PRATIQUE DE LA SOUCHE 503 POUR LA CULTURE DES PROTOZOAIRES PARASITES INTRACELLULAIRES

1. **Toxoplasma gondii** 54
2. **Leishmania donovani** 58
3. **Leishmania tropica** 60
4. **Leishmania enrietti** 60
5. **Trypanosoma cruzi** 61
6. **Conclusion** 61

C. — GREFFE DES CULTURES CELLULAIRES

I. — TRAVAUX ANTERIEURS 62
II. — TRAVAUX PERSONNELS 62
1. Greffes hétérologues 62
a) Matériel et Méthode 62
b) Résultats 63
2. Greffes homologues 64
a) Matériel et Méthode 64

b) Résultats 66
c) Discussion 68

CHAPITRE III : **LES CHROMOSOMES DANS LE SARCOME DE STICKER**

I. — TRAVAUX ANTERIEURS 73
A. — Les chromosomes chez le Chien 73
B. — Cas du sarcome de Sticker 73
C. — La chromatine sexuelle 74
II. — TRAVAUX PERSONNELS 75
A. — Matériel et Méthode 75
B. — Résultats 77
a. — Cellules somatiques normales du Chien 77
1) Etude de l'euploïdie 77
2) Aneuploïdie 79
3) Remarques 79
b. — Sarcome de Sticker 80
c. — Souche 503 81
Evolution avec le temps 83
Corrélation entre le nombre de chromosomes et le nombre de chromosomes médiocentriques 83
d. — La chromatine sexuelle 83
C. — Discussion 86

CHAPITRE IV : **ESSAIS SUR LA TRANSMISSION A-CELLULAIRE DU SARCOME DE STICKER**

A. — ESSAIS SUR LA TRANSMISSION A-CELLULAIRE DU SARCOME DE STICKER PAR FILTRATS OU SURNAGEANTS

I. — TRAVAUX ANTERIEURS ..... — 89
II. — TRAVAUX PERSONNELS 90
a) Matériel et Méthode 90
b) Résultats 92
c) Discussion 93

B. — LES ACIDES NUCLEIQUES DU SARCOME DE STICKER

I. — TRAVAUX ANTERIEURS 93
II. — TRAVAUX PERSONNELS 94
a) Matériel et Méthode 94
b) Résultats 97
c) Discussion 98

CHAPITRE V : **ETUDE DES SARCOMES APPARENTES AU SARCOME DE STICKER**

A. — LE RETICULO-SARCOME CUTANE

I. — TRAVAUX ANTERIEURS 101
II. — TRAVAUX PERSONNELS 102
1. Cas observés 102
2. Anatomo-clinique 104
3. Histologie pathologique 105
4. Greffe homologue 107
a) Matériel et Méthode 107
b) Résultats 108
5. La culture « in vitro » 109
a) Matériel et Méthode 109
b) Résultats 109
c) Remarques 110
6. Essais de transmission a-cellulaire 111
a) Matériel et Méthode 111
b) Résultats 111
c) Discussion 112
7. Nature du réticulo-sarcome cutané du Chien 112

B. — LE MASTOCYTOME

C. — SYNTHESE : LE SYNDROME DES HEMATODERMIES NODULAIRES MALIGNES DU CHIEN

CHAPITRE VI : **DISCUSSION GENERALE**

CHAPITRE VII : **CONCLUSIONS GENERALES**

BIBLIOGRAPHIE 131

INTRODUCTION ET HISTORIQUE GENERAL

I. — DEFINITION

Le sarcome dit « de Sticker » représente une affection contagieuse, propre au Chien, caractérisée cliniquement par le développement de néoplasies au niveau de l'appareil génital externe des deux sexes, restant souvent localisées, mais pouvant être envahissantes et donner des métastases à distance. Ces tumeurs sont constituées de plages homogènes d'éléments cellulaires considérés actuellement comme d'origine réticulaire.

Cette affection est transmise naturellement par contact vénérien.

II. —SYNONYMIE

1. — Sarcome ou lympho-sarcome vénérien, contagieux, transmissible ou transplantable.
2. — Condylome contagieux, vénérien ou canin.
3. — Histiocytome.

Aujourd'hui, les auteurs anglo-saxons désignent cette maladie sous le terme de « transmissible venereal tumor of the dog ».

En Europe, particulièrement en France et en Italie, on l'appelle « sarcome de Sticker » en hommage aux importants travaux que fit cet auteur au début du siècle.

III. — HISTORIQUE DE L'AFFECTION

Cette affection a été signalée pour la première fois en 1820 par HUZARD. Elle a fait l'objet d'un article en 1828 par VATEL dans ses « Eléments de Pathologie vétérinaire ». Cet auteur faisait la distinction entre les tumeurs vénériennes de la chienne et les fibromes du vagin. La même année, DELABERE-BLAINE, médecin anglais, constate à partir du vagin et de la verge des chiens un écoulement sanguinolent qui semble provenir de lésions ulcéreuses de ces organes, entourées d'excroissances fongueuses.

Ce n'est qu'en 1877 que NOVINSKY démontre en greffant la tumeur à trois jeunes chiens, la transmissibilité de l'affection. Par la même occasion on peut constater que cet auteur est le précurseur de toutes les expériences futures de greffes sur le cancer. On a pu le dénommer à juste titre « le grand père de la cancérologie expérimentale » (SHABAD, 1950).

WEHR constate, en 1889, la résorption spontanée des greffes sous-cutanées.

Cinq ans plus tard, DUPLAY et CAZIN réussissent à transmettre l'affection par inoculation intra-pénienne.

En 1897, 1898, 1899, SMITH et WASHBOURN établissent enfin la nature vénérienne de la maladie et apportent la preuve expérimentale de sa transmissibilité par le coït.

Depuis, d'assez nombreux travaux se sont suivis, tendant d'une part à situer l'affection dans son cadre nosologique et d'autre part à démontrer son étiologie.

Les tableaux qui suivent montrent la suite des travaux qui ont été faits jusqu'à nos jours.

Année	Auteurs	Objet du travail
1820	HUZARD	Anatomo-clinique
1828	VATEL	— —
—	DELABERE-BLAINE	— —
1877	NOVINSKY	Greffes
1889	WEHR	—
1894	DUPLAY et CAZIN	—
1895	GEISSLER	Anatomo-clinique
—	HANSEMAN	— —
1897	SMITH et WASHBOURN	— —
1898	— —	Greffes
1899	— —	—
1902	WHITE	Anatomo-clinique, greffes
1904	STICKER	— — —
—	DUNSTAN	— —
1905	BASHFORD, MURRAY et CRAMER	— —
—	HOBDAY	— — ,thérapeutique
—	STICKER	Greffes
—	SAN-FELICE	Etiologie
1906	BEEBE et EWING	Anatomo-clinique, greffes
—	STICKER	Greffes
1907	BEEBE	Anatomo-clinique
—	BEEBE et TRACY	Thérapeutique
—	BERGELL et STICKER	Anatomo-clinique
—	BORREL	Etiologie
—	METTAM	—
1908	SELIGMAN	Anatomo-clinique
—	STICKER	Thérapeutique
—	WADE	Anatomo-clinique
1909	HEBRANT et ANTOINE	— —
—	HUNTER, LAWS et LOEB	— —
1911	JOUGLA	— —
1912	Van DUNGERN	— —
1927	HANDEMER et BABLET	— —
—	MATSUBA et HIROYE	Greffes, cultures de tissus
—	NOVAK et CRAIG	Anatomo-clinique
1928	BALL et ROSSI	— —
1929	FELDMAN	— —
1931	GALLEGO	— —

Année	Auteurs	Objet du travail
1932	FELDMAN	— —
—	WONG et K'ANG	Thérapeutique
1934	De MONBREUN et GOODPASTURE	Anatomo-clinique, greffes immunologie
—	STUBBS et FURTH	Anatomo-clinique, greffes
—	HENRY et BORRY	— —
1935	VOS	— —
1936	JACKSON	— —
—	AJELLO	— — —
—	MONTPELLIER, DIEUZEIDE et KAALUND-JORGENSEN et	— —
1937	VICREY THOMSEN	— —
—	LESTOQUARD	— —
1939	MONTPELLIER, MERCIER et LAFFARGUE	— —
—	AJELLO	— —
1942	PELOURO	— —
1943	—	— —
1944	JACKSON	Cytologie
1945	DRIEUX	Anatomo-clinique
1946	BENOIT et PUGET	Thérapeutique
—	LESBOUYRIES	Anatomo-clinique
1947	GLEASON	— —
—	LACROIX et RISER	— —
—	MAC-CLELAND	— —
1948	CORREIA-MADEIRA	Cytologie
—	GUERREAU	Th. vét.
—	NANTA et Col.	Epidémiologie
1949	AGNESE	Anatomo-clinique
—	AJELLO	— —
—	LUSBAUGH et STEINER	Greffes
—	NANTA et Col.	Epidémiologie
—	LACOUR	Th. vét.
—	GOUAUD	—
—	NEVEU	—
—	RUST	Anatomo-clinique
1950	NANTA et Col.	— —
—	SOLACROUP	Th. vét.
—	BLOOM, PAFF et NOBACK	Cytologie, culture de tissus
—	THIERY	Greffes
—	—	Acides nucléiques
1951	LASSERRE et Col.	Embryo-cultures
—	NANTA et Col.	Thérapeutique
1952	DERBAL et DAUDEL	— ,greffes
—	KARLSON et MANN	Greffes
—	MARQUES et Col.	Thérapeutique
1953	NANTA et Col.	Anatomo-clinique
—	CADEILLAN	Th. vét.
—	WATANABE et HATA	Cytologie
1954	THIERY	Greffes
—	PAROT	Th. vét.

Année	Auteurs	Objet du travail
1954	WATANABE et URANO	Anatomo-clinique
1955	SHIMKIN	Historique
1956	AJELLO	Cultures de tissus
—	ANDRAL	Anatomo-clinique
—	WATANABE et AZUMA	Cytologie, chromosomes
1957	WATANABE, HOSAKA et AZUMA	Chromosones
—	UTZIG et SAMBORSKI	Thérapeutique
—	WOODS	Anatomo-clinique
1958	HATAYA, SHIRASU et TAKEUCHI	Thérapeutique
—	TAKAYAMA	Chromosomes
—	RESSANG et Col.	Anatomo-clinique
1959	HATAYA et Col.	Thérapeutique
1960	BONADUCE, AJELLO et COMPAGNUCCI	Bio-chimie
—	DOZZA et TORLONE	Transmission acellulaire
—	LAGNEAU et CARTAUD	Cultures de tissus
—	VLADUTIU, MURGU et BLIDARU	Thérapeutique
1961	AJELLO	Microscope électronique
	ARBEITER	Thérapeutique
—	NIELSEN et COLE	Greffes
—	VLADITIU et CIUREA	—
—	TAKAYAMA et MAKINO	Chromosomes
—	BEAUQUIER	Th. vét.
—	VLADITIU et Col.	Thérapeutique
—	TAKAYAMA et OJIMA	Cytophotométrie
1962	— —	Chromosomes
—	AJELLO et GIMBO	Greffes
1963	BARRON et Col.	Métastases oculaires
—	PRIER	Cultures de tissus
—	MAKINO	Chromosomes

IV. — REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Cette maladie est répandue dans le monde entier, sans cependant avoir une distribution géographique uniforme. Elle est bien connue en Europe et en Amérique du Nord, aussi bien qu'au Japon. La plupart des études sur cette tumeur ont été faites dans ces contrées.

On la connaît au Brésil (AGNESE), à Puerto-Rico (RUST), en Chine (WONG et K'ANG), en Indochine (HANDEMER et BABLET), à Java (VOS), en Nouvelle-Guinée (SELIGMAN).

En Afrique du Sud, JACKSON a bien étudié cette affection, de même ANDRAL en Ethiopie et au Soudan ex-français DERBAL et DAUDEL.

A l'intérieur d'un continent il peut y avoir des variations dans la fréquence d'apparition de la maladie dans l'espace et dans le temps ; ainsi KARLSON et MANN les signalent aux Etats-Unis. En Europe, la maladie est rare au Danemark où KAALUND-JORGENSEN et THOMSEN décrivent le premier cas en 1937 et rarissime en Suède.

En France elle est connue sur tout l'ensemble du territoire.

En ce qui concerne l'Algérie nous considérons cette affection comme

rare. Ce n'est qu'en 1936 que notre Maître J.-M. MONTPELLIER en a pour la première fois décrit un cas ; il en a signalé un second en 1939. Entre 1950 et 1963, au Laboratoire de Pathologie Comparée du Centre Algérien de Lutte contre le Cancer, nous n'avons fait que 31 examens de ce type de tumeur et encore 11 d'entre elles provenaient de France. Nous avons fait une enquête auprès des vétérinaires de notre province et tous ont été d'accord sur la rareté de la maladie. Or, étant donné la divagation des chiens dans ce pays, on serait en droit de s'attendre à une grande fréquence de l'affection. Il y a dans l'agglomération algéroise plus de cas de rage que de cas de sarcome de Sticker. Au début de notre travail nous avons pensé à une sorte d'immunité géographique analogue à celle de la clavelée chez le mouton nord-africain. Notre expérimentation personnelle nous a montré qu'il n'en était rien.

V. — ETUDE CLINIQUE

Symptômes

Le sarcome de Sticker affecte dans la presque totalité des cas les organes génitaux. Chez le mâle, il atteint aussi bien le pénis que le fourreau et son lieu le plus fréquent d'élection est la base de la verge.

Chez la femelle, il se localise sur les parois vaginales et vulvaires (fig. 1).

Dans tous les cas, l'affection débute par un prurit assez marqué. L'animal lèche fréquemment son fourreau. Un léger écoulement glaireux s'écoule du prépuce attirant l'attention du clinicien qui découvre alors une inflammation catarrhale de la muqueuse pénienne. Il faut attendre un délai de deux semaines pour voir cette muqueuse tapissée de petites granulations grisâtres ou teintées de sang, bien circonscrites, rappelant des vésicules, mais en différant en ce qu'après leur ponction, il ne s'écoule pas de liquide.

Ces granulations donnent des nodules fermes rouges. Le développement des nodules sur le pénis et leur confluence déforment le fourreau, la tumeur peut s'ulcérer en surface et de petites hémorragies plus ou moins fréquentes et abondantes sont observées. Un caractère important de ces tumeurs est qu'elles saignent au moindre attouchement. La tumeur a souvent l'aspect d'un chou-fleur et peut atteindre le diamètre de 5 cm et plus. Quand la tumeur siège à l'extrémité du pénis, le méat urinaire peut se trouver recouvert avec risque d'obstruction. Parfois la néoplasie s'étend essentiellement à la face interne du fourreau qui paraît épaissi, formant une sorte de cuirasse rigide, mamelonnée, engainant la verge de telle sorte qu'il existe une sorte de phimosis acquis empêchant le gland de sortir du fourreau (BALL et ROSSI, 1928). La miction reste en général possible.

L'irritation vue chez le mâle existe également chez la femelle sur laquelle on remarque souvent, au début, une exsudation de la commissure vulvaire. Ici encore, l'animal se lèche fréquemment au niveau des organes génitaux. Comme chez le mâle apparaissent des granulations puis des nodules. Ces nodules croissent de taille et peuvent se présenter sous un aspect quelque peu variable selon les localisations et le moment de l'évolution : saillant à la surface des muqueuses, le nodule est tantôt bourgeonnant, ressemblant à une sorte de framboise, de fraise ou de chou-fleur par ses végétations, blanches, rosées, rouges, sessiles ou non, rappelant les « crêtes de coq » de l'homme, tantôt en plaques plus ou moins vastes, s'étendant en nappes à la surface

de la muqueuse ; de couleur blanc rosé, blanc grisâtre, translucide, d'aspect encéphaloïde, sa consistance est extrêmement variable, très ferme, très résistante par endroits, très friable, très molle, s'écrasant facilement sous les doigts, par ailleurs. Comme chez le mâle, la tumeur est très bien irriguée et saigne au moindre attouchement.

Les nodules s'étendent plus ou moins rapidement et l'envahissement du vagin peut être tel qu'il y ait obstruction de la cavité vaginale, déformation de la vulve ou même infiltration du tissu musculaire du périnée et ulcération des parois vaginales. Les mictions peuvent devenir difficiles et l'on peut observer parfois des phénomènes de rétention urinaire et d'infection secondaire (cystite ascendante).

Evolution

La durée d'incubation de la maladie est assez difficile à préciser. Expérimentalement elle est fixée au minimum de 14 jours, mais AJELLO a observé des périodes d'incubation dépassant un mois. Les granulations apparaissent qui donnent des nodules qui prolifèrent et deviennent alors très envahissants.

L'affection à ce stade conduit rarement à la mort. Cependant, elle peut déterminer, à la longue, une gêne fonctionnelle pouvant être à l'origine d'une dysurie, qui aboutit à l'amaigrissement progressif et à la cachexie. Dans d'autres cas, amaigrissement et cachexie s'installent soit à partir des lésions, soit à l'occasion d'infections banales secondaires. Signalons enfin qu'en 1908, WADE a observé sur plusieurs chiennes atteintes une néphrite intersticielle qu'il rapportait à une toxine soluble des cellules tumorales et il en avait déduit que l'affection pouvait être identifiée à un granulome infectieux.

Métatases

Les tumeurs vénériennes dont nous avons vu les stades de début ne se contentent pas de rester localisées aux régions purement génitales, mais peuvent essaimer sous forme de métastases. Les premiers auteurs qui ont étudié cette maladie ont relativement peu décrit de cas de métastases naturelles, mais surtout des cas de métastases de greffes (WEHR, DUPLAY et CAZIN, STICKER, etc.).

Une des premières descriptions est celle de JOUGLA en 1911 qui relate une localisation secondaire de polypes du vagin dans le cerveau, néoplasie de même type histologique sur le plancher du ventricule latéral gauche.

En 1927 MATSUBA et HIROYE signalent qu'ils ont vu dans un grand nombre de cas des métastases dans les ganglions inguinaux, qui peuvent atteindre la taille d'un œuf de poule, et de plus la présence chez un chien naturellement infecté de plus de 250 nodules sous-cutanés couvrant toute la surface du corps. BALL et ROSSI aussi signalent un cas de métastase dans les ganglions inguinaux. MONTPELLIER et ses collaborateurs décrivent les cas d'une part d'un chien porteur d'une tumeur de la vulve et d'une tumeur grosse comme une noisette entre la 5' mamelle et la vulve, d'autre part d'un chien porteur de tumeurs du fourreau et de nodules dans l'aine et sur les bourses.

AJELLO en 1938 sur 84 cas, en constate 3 avec métastases : dans la région costale gauche, dans les ganglions et sur la paupière. LESBOUYRIES en 1946 note la concommittance de la néoplasie sur le vagin et sur les ovaires, corps et cornes utérines étant indemnes.

PAROT dans sa thèse en 1954 a fait une bonne étude des localisations extra-génitales du sarcome de Sticker. Sur 271 observations recueillies à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse entre 1947 et 1950 portant sur les polypes vénériens, il relate 18 cas où des lésions tumorales siègent en dehors de la sphère génitale : dans 10 cas seuls les ganglions inguinaux étaient atteints, le reste avait des localisations variées : ganglions internes, foie, rate et peau.

RUST en 1949 rapporte un cas avec métastases cutanées, spléniques et hépatiques et ANDRAL en 1956 celui d'une femelle avec une tumeur de la vulve et des métastases spléniques. Enfin, BARRON et col. en 1963 ont étudié des cas de métastases oculaires.

Pour notre part, nous avons observé le cas d'un chien atteint de polypes du fourreau et de plusieurs nodules cutanés au niveau du cou.

D'un point de vue synthétique, nous pouvons résumer ainsi l'évolution du sarcome de Sticker :

1. — Formes purement génitales

C'est le cas banal, le cas pour lequel on consulte un vétérinaire et dont nous avons décrit plus haut les symptômes. Le chien mâle ou femelle est porteur de nodules tumoraux sur la verge ou dans le vagin. Si l'on dispose d'un appareil de radiothérapie, quelques séances de 200 à 250 r suffisent à faire disparaître les lésions.

2. — Formes paragénitales

Il y a atteinte des ganglions inguinaux superficiels. A ce stade le traitement aux rayons est encore opérant mais en augmentant les doses.

3. — Formes généralisées

On trouve des métastases d'une part dans les ganglions abdominaux internes : iléo-pelviens, lombo-aortiques, mésentériques, d'autre part dans le foie et la rate qui sont parsemés de nodules de 1 à 2 cm de diamètre, voire dans le poumon.

Enfin, en plus de ces métastases internes on peut voir des métastases cutanées : il s'agit de nodules situés dans le derme, non adhérents au plan profond, de forme discoïdale, aplatis, de 1 à 2 cm de diamètre, de 5 à 10 mm de hauteur. Leur nombre varie de 1,2 à 100 ou plus. Leur centre peut se creuser en ulcère.

A ce stade, il n'existe à l'heure actuelle aucune thérapeutique.

4. — Formes extra-génitales

Certains auteurs : FELDMANN, AJELLO, PAROT, LACROIX et RISER ont décrit des cas de tumeur de même type histologique que les tumeurs vénériennes sans atteinte du pénis ou du vagin. Ils admettent qu'il s'agit de greffes accidentelles au contact de chiens contaminés. Nous examinerons ce genre de tumeur dans le dernier chapitre de notre exposé.

VI. — ANATOMIE PATHOLOGIQUE

La tumeur de Sticker naturelle est constituée par des nappes homogènes de cellules pressées les unes contre les autres et de morphologie assez semblable. Il s'agit d'éléments arrondis, à cytoplasme assez abondant, aux limites pas toujours nettement visibles, mais ce caractère dépend des conditions de fixation (Figures 9 et 10).

Les noyaux sont arrondis, souvent irréguliers, encochés, à membrane nucléaire accusée, plutôt clairs avec une chromatine peu épaisse assez grossière, souvent nucléolés.

Le cytoplasme est très finement granuleux, légèrement acidophile. Il n'y a pas de granulations métachromatiques.

On distingue çà et là des mitoses.

Ces éléments ont les caractères de cellules réticulaires, certaines jeunes, peu différenciées, d'autres de type réticulo-histiocytaire.

Quelques éléments lymphoïdes sont disséminés dans la nappe tumorale. Celle-ci, dans l'ensemble, est peu vascularisée.

Le stroma est pauvre, réduit à quelques axes conjonctifs qui se résolvent en traînées plus fines, constituant une sorte de réticulum très imparfait. Ce réseau de réticuline peu important est formé de fibres grêles qui entourent des amas de cellules. Il n'y a pas de réseau péricellulaire.

De l'examen des coupes histologiques on peut dire qu'il s'agit d'un **réticulo-histiocyto-sarcome.**

L'étude des frottis ou des empreintes de tumeurs colorés par le May-Crünwald-Giemsa permet de mieux préciser la nature des cellules de la tumeur.

En gros, on peut considérer 3 sortes de cellules :

Première catégorie. — Nous avons des cellules assez volumineuses, d'un diamètre de 15 μ en moyenne, à cytoplasme arrondi ou irrégulier avec des expensions polychromatophiles, cytoplasme assez abondant aux limites régulières, le plus souvent homogène avec parfois de petites vacuoles bleu clair au Giemsa, peu d'inclusions (débris macrophagiques).

Le noyau est central ou légèrement excentré, toujours à distance et sans point de jonction avec le bord cytoplasmique, rond, régulier, avec une chromatine disposée en mottes grossières. Il contient un ou très rarement deux nucléoles à l'emporte-pièce bleus.

Ces cellules sont le plus souvent isolées, mais on trouve quelques formations symplasmiques où plusieurs noyaux du type précédemment décrit se disposent dans un cytoplasme indivis.

Deuxième catégorie. — Cellules qui se différencient des précédentes par les caractères suivants :

1° taille plus grande ;

2° cytoplasme plus abondant, polychromatophile, presque toujours vacuolisé, à petites vacuoles.

Leurs noyaux arrondis, réguliers, sont centraux, quelquefois adhérents à la périphérie cellulaire, sensiblement plus foncés que les précédents. La chromatine y est plus dense et aussi plus régulière. Enfin, on peut y voir par-

fois un nucléole, souvent on n'en voit aucun. Ces cellules présentent également une activité macrophagique.

Troisième catégorie. — Quelques rares éléments de type lymphoïde et de type plasmocytaire jeune.

En fait, la première catégorie correspond à des cellules réticulaires jeunes, indifférenciées, immatures.

La deuxième catégorie correspond à des éléments plus évolués avec une ébauche de différenciation histioblastique ou parfois plasmoblastique.

De l'examen des coupes histologiques suivi de l'examen des cellules colorées par la méthode panoptique on peut considérer le sarcome de Sticker comme un **réticulo-sarcome à différenciation histiocytaire.**

Pendant longtemps les auteurs ont été en désaccord sur la nature exacte de cette tumeur, désaccord qui s'est traduit par le grand nombre de désignations qui lui ont été données. Pour STICKER lui-même, il s'agissait d'un lympho-sarcome transmissible et à sa suite nombreux ont été ceux qui ont employé le terme de lympho-sarcome ou de sarcome à cellules rondes. FELDMANN en 1932 fait les premières réserves et considère que la désignation de « lympho-sarcome » est faite pour des raisons morphologiques seulement, l'histogénèse exacte n'étant pas déterminée. Pour JACKSON en 1936 cette tumeur aurait la même origine que les tumeurs de la base du cœur et serait un neuroblastome.

Pour De MONBREUN et GOODPASTURE en 1934 son origine ne serait pas déterminée, mais elle serait dérivée probablement de la série lymphocytique. La même année STUBBS et FURTH pensent qu'il n'y a pas de preuve pour que cette tumeur soit de nature lymphocytique.

Le premier qui ait eu une opinion différant nettement a été notre Maître J.-M .MONTPELLIER qui considérait ce néoplasme comme un lympho-réticulo-endothélio-sarcome (1936).

Un an après KAALUND-JORGENSEN et THOMSEN ont eux aussi pensé que les cellules du sarcome de Sticker ressemblaient à des cellules réticulaires d'où le nom de réticulo-sarcome, mais par prudence ils préféraient conserver le terme de tumeur vénérienne transmissible. MULLIGAN parle d'histiocytome mais sans preuve convaincante. En 1950 BLOOM, PAFF et NOBACK ont considéré que ces cellules néoplasiques étaient des « mature end cells » d'origine réticulo-endothéliale mais eux aussi préfèrent employer la dénomination de tumeur vénérienne transmissible du chien. La même année NANTA et ses collaborateurs après avoir fait une étude cytologique détaillée préfèrent classer la tumeur parmi les réticuloses métaplasiques ou plutôt en font une granulomatose voisine du Mycosis fongoïde de l'homme. On ne retrouve pourtant pas dans le sarcome de Sticker les cellules géantes, les éosinophiles, les mastocytes que l'on voit dans le Mycosis fongoïde. C'est pourquoi nous préférons pour notre part considérer cette tumeur comme entrant dans le grand groupe des réticulo-sarcomes.

VII. — CARACTERE CONTAGIEUX DE LA MALADIE

Le caractère contagieux de l'affection a été établi d'une part par l'observation clinique, d'autre part par l'expérimentation.

A. — SMITH et WASHBOURN en 1898 démontrèrent pour la première fois la transmission naturelle vénérienne de la maladie. Un chien atteint d'une tumeur du pénis avait monté 12 chiennes en quelques mois, 11 d'entre elles furent infectées. Un mois après le part, on remarqua dans chaque cas une tumeur sur la paroi vaginale ressemblant quelque peu à une framboise. La tumeur a grossi jusqu'à avoir la taille d'une orange et remplir le vagin. Les chiennes étaient d'âge varié, les plus jeunes étant moins sévèrement atteintes que les plus vieilles qui durent être sacrifiées.

Un second chien qui avait monté trois chiennes affectées fut par la suite trouvé porteur d'une tumeur du pénis. A son tour, il monta deux chiennes saines et transmis la tumeur à l'une d'elles.

En 1902, C.P. WHITE rapporta deux cas semblables apparus chez des bull-dogs de pure race.

B. — Un certain nombre de chercheurs ont essayé de reproduire l'affection en frottant la muqueuse du vagin scarifiée avec un fragment de tumeur (DUPLAY et CAZIN 1894) ou avec le fluide qui s'écoule du fourreau ou de la vulve.

NOVAK et CRAIG en 1927 n'obtinrent pas de résultats par la première de ces méthodes.

STUBBS et FURTH en 1934 frottèrent la muqueuse scarifiée du pénis d'un chien avec un fragment de tumeur : une tumeur apparut 70 jours plus tard et se développa en chou-fleur sur le gland. Par contre, ils instillèrent une émulsion de tissu tumoral sur la conjonctive intacte de 3 chiens : aucun ne développa de tumeur.

En 1952 DERBAL et DAUDEL réalisèrent la transmission sur deux femelles vivant en pleine brousse soudanaise, sans possibilité de contact avec des mâles contaminés, par un simple frottement de la muqueuse vaginale avec un coton imbibé de l'écoulement vaginal d'une chienne atteinte d'une volumineuse tumeur. Le début de l'évolution s'est manifesté 15 jours après la contamination dans le premier cas et 20 jours après dans le second par un écoulement sanguinolent provenant de polypes à large base aplatis contre la muqueuse. Un mâle mis en cohabitation avec ces deux chiennes présenta au bout d'un temps très court, sur le pourtour du fourreau, des bourgeons charnus prolifèrant rapidement.

SOLACROUP en 1950 recueille le liquide préputial d'un chien porteur de lésions péniennes. Il dépose ce suc sur la muqueuse vaginale d'une chienne : un massage très doux des parois du vagin termine cette opération. Cinq mois plus tard, la chienne présentait en cet endroit des formations polypeuses assez importantes.

WATANABE et ses collaborateurs ont bien étudié de 1953 à 1956 le liquide purulent qui stagne dans les petites dépressions superficielles de la surface des tumeurs et qui finit par s'écouler par l'orifice de la vulve ou du fourreau. Ce fluide contient à côté de leucocytes, de microcoques et de bacilles, des cellules tumorales en suspension dont certaines en division mitotique. Pour WATANABE « il est hautement probable que les cellules suspendues dans le fluide de la tumeur vénérienne d'un chien sont naturellement transférées dans la muqueuse génitale externe d'un autre chien durant la copulation. »

VIII. — LE PROBLEME DU SARCOME DE STICKER

Le sarcome de Sticker — venereal transmissible tumour — est une tumeur animale qui présente un grand intérêt.

Historiquement, c'est la première tumeur transmise par greffe.

Sur le plan médical, c'est une maladie vénérienne, la seule qui soit tumorale. Elle se greffe facilement, elle est très radio-sensible (MARQUES et col. 1952) et cependant jusqu'à présent tous les auteurs ont été d'avis divergents quant à sa place au point de vue nosologique car elle présente le paradoxe d'offrir l'image histologique d'un sarcome hautement malin et de rester longtemps localisée sans affecter outre mesure la santé de l'animal.

C'est une tumeur du Chien. Par son mode de vie, par sa taille, le Chien est proche de l'Homme. On pourra expérimenter sur lui davantage que chez l'Homme, mais moins bien que chez les Rongeurs ou les Oiseaux qui présentent l'avantage de la maniabilité, du nombre et de la sélection.

Dans la nature cette maladie se transmet par le coït. Syphilis, dourine, lympho-granulomatose bénigne sont des maladies vénériennes dont on connaît l'agent : Tréponème, trypanosome, myagawanelle. On n'a jamais pu isoler de germe figuré agent du sarcome de Sticker. On a pensé depuis longtemps à un virus, mais l'échec des inoculations de filtrat de tumeur avait finalement amené les auteurs à considérer celle-ci comme résultant d'une greffe de cellules tumorales lors du coït et à nier la présence d'un virus oncogène.

Depuis une dizaine d'année le problème de ces virus est en complète évolution avec l'application de méthodes d'étude nouvelles : cultures cellulaires, acides nucléiques et inoculation à l'animal nouveau-né voire microscopie électronique.

C'est pourquoi nous avons essayé à l'aide de ces méthodes de mettre en évidence un agent oncogène dans le sarcome de Sticker.

1. — Dans un premier temps nous avons établi une souche de tumeurs greffées chez le Chien destinée d'abord à nous fournir du matériel de travail et accessoirement des éléments d'observation.

Nous avons également par cette méthode directe essayé de passer cette tumeur propre au Chien chez d'autres animaux, des Carnivores (**Chacal**) et des Rongeurs (**Hamster** en particulier).

2. — Dans un second temps nous avons étudié le sarcome de Sticker en cultures histiotypiques. En supposant qu'il y ait eu un virus oncogène dans la tumeur initiale, nous avons pensé qu'au fur et à mesure des passages, il pourrait subir une modification de sa virulence en augmentation ou en diminution.

Alors que S. STEWART et B. EDDY quand elles ont mis en évidence le virus polyome, on fait des passages sur des explants primaires en inoculant chaque fois le milieu de la culture précédente, nous avons pensé qu'il était plus simple d'utiliser les cellules tumorales elles-mêmes et nous avons essayé de créer une souche de culture continue.

Nous avons établi les modalités de la croissance « in vitro » de la tumeur, ses caractéristiques chromosomiques et nous l'avons inoculée au Chien et aux Rongeurs.

3. — Nous avons tenté la transmission acellulaire de la tumeur d'une part avec des filtrats et des surnageants de broyats inoculés au Chien nouveau-né, à l'œuf de poule incubé et aux cultures cellulaires, d'autre part avec les acides nucléiques extraits de la tumeur, RNA et DNA, inoculés à l'animal nouveau-né.

4. — Nous avons étudié une maladie du Chien semblable au point de vue anatomo-pathologique : le **réticulo-sarcome cutané.**

Sur une moins grande échelle, nous avons suivi le même plan de travail : greffes et cultures cellulaires.

5. — Enfin, en conclusion, nous avons essayé de voir quelle est la place qu'occupe le sarcome de Sticker dans le cadre des tumeurs cutanées du Chiens issues du système réticulo-histiocytaire.

Nos ambitions étaient étendues et nous aurions voulu mener à terme certains aspects qui n'ont fait qu'être effleurés, mais le manque de matériel souvent et surtout les événements révolutionnaires d'Algérie qui nous ont obligé à abandonner notre pays et notre laboratoire ne nous pas permis d'aller plus loin.

CHAPITRE PREMIER

I. — RECHERCHES SUR LA GREFFE DU SARCOME DE STICKER

A. — LA GREFFE DU SARCOME DE STICKER CHEZ LE CHIEN

I. — GENERALITES SUR LES GREFFES DE CANCER DU CHIEN

A l'heure actuelle, on ne connaît que 3 types de tumeurs transmissibles en série chez le Chien : le sarcome de Sticker, le carcinome de ALLAM et le mastocytome de LOMBARD et MOLONEY. Ce chiffre est très faible quand on considère le nombre de tumeurs transmissibles chez les Rongeurs et les Oiseaux.

De nombreux essais ont été faits pour trouver d'autres tumeurs transplantables chez le Chien.

Mac WORTHER et PRIME en 1916 ont pu transplanter chez 5 chiens sur 20 un chondro-sarcome mammaire apparu chez un terrier de 11 ans.

MANN en 1919 essaya la transplantation d'un carcinome mammaire et trouva des réponses chez 6 animaux sur 134. Seul, un transplant cependant persista 41 jours, le reste devint nécrotique et fut résorbé entre 7 et 12 jours.

ALLAM et ses collaborateurs échouèrent dans de nombreux essais pour transplanter 13 néoplasmes canins différents par des voies diverses chez le chiot. Après l'instauration de l'irradiation totale du corps et d'un traitement à la cortisone chez les récepteurs, ils réussirent, en 1954, la transplantation homologue d'une tumeur anaplasique de la thyroïde d'un chien. Les chiots récepteurs recevaient de 300 à 500 r en addition d'un traitement avec 2 à 5 mg de cortisone par livre de poids le jour de l'implantation.

Les transplants ont été faits sur 30 passages en 1956.

Par la même méthode NIELSEN et COLE en 1961 réussirent à transmettre un ostéo-sarcome, une tumeur mixte de la mamelle et un adénocarcinome de l'ovaire chez des chiots irradiés et sous cortisone.

En 1959 LOMBARD et MOLONEY ont greffé avec succès sous la peau de chiots âgés de 1 à 30 jours un mastocytome cutané spontané du chien et ce sur 7 passages. La tumeur greffée a été transmise par filtrat sur 3 passages.

II. — TRAVAUX ANTERIEURS

Le 20 septembre 1876 NOVINSKI commença une série d'essais avec une femelle de 6 ans porteuse d'une tumeur de l'utérus et de la voûte du vagin. Le diagnostic histologique était « myxosarcome médullaire ». Des fragments frais de la tumeur furent inoculés par 2 incisions bilatérales de la peau chez 2 chiots. Un mois après des nodules apparurent au point d'inoculation qui crûrent lentement mais progressivement. Au bout de 2 mois chaque animal avait une tumeur de la taille d'un œuf. L'aspect histologique ressemblait à la tumeur originelle. Une biopsie fut faite sur un de ces chiots et le tissu réinoculé sur un chien de 2 mois par 2 incisions. Les blessures guérirent et 2 mois après, un nodule apparut sur chaque cicatrice. Les tumeurs avaient le même aspect histologique que le premier transplant. On ne trouva pas de métastase à l'autopsie du chien mort le 4e mois après la greffe.

Pendant près d'un siècle on a répété l'expérience princeps de NOVINSKI sur une plus grande échelle, par des voies différentes. On n'a fait que confirmer la transplantabilité des tumeurs vénériennes du chien.

En 1889 WEHR fit une série d'inoculations avec ce qu'il considérait comme un carcinome. Il inocula 36 chiens sous la peau. Dans la plupart des cas des tumeurs apparurent au point d'inoculation, mais disparurent en 6 à 8 semaines. Des fragments de tumeurs prélevées durant leur cours montrèrent la même structure que la tumeur originale.

En 1894 DUPLAY et CAZIN paraissent être les premiers à émettre l'idée que les tumeurs vénériennes pouvaient être de nature inflammatoire. A partir d'une chienne dont le vagin contenait 3 tumeurs de la taille d'une noisette, ils firent l'exérèse de l'une d'elles et la frottèrent sur la muqueuse scarifiée de 2 mâles. Chez les 2 animaux des tumeurs se développèrent qui étaient identiques à la tumeur d'origine. De plus chez l'un d'eux un nodule tumoral apparut dans un testicule.

En 1895 GEISSLER inocula une série de chiens avec des fragments de la taille d'un grain de mil pris dans la partie profonde d'une tumeur en chou-fleur apparue sur le prépuce d'un chien. Dans 2 cas l'inoculation fut réussie. Dans l'un il y eut régression, mais dans l'autre, à l'autopsie de l'animal, on vit des métastases sur la rate, le foie, le péritoine ainsi que sur la plèvre pariétale.

En 1898 SMITH et WASHBOURN cherchant à voir si la tumeur était transmissible par greffe et s'il y avait une augmentation de la virulence avec les passages réussirent à inoculer 13 chiens sur 17 par transplantation sous-cutanée de tissus. Ils firent 6 passages en série. Les tumeurs mirent de 21 jours à 3 mois pour apparaître. La taille des petits nodules s'accroissait et ils formaient des masses rondes, lobulées, au début mobiles sous la peau ; au bout d'un certain temps la peau devenait adhérente. La taille ultime était de 1,5 à 3 pouces de diamètre. A partir de ce stade maximum, la régression était proche. Les tumeurs devenaient flasques et molles et régressaient jusqu'à ce qu'il ne reste rien de leur présence. En moyenne la chute demandait 3 mois. Ils constatèrent que, même quand la régression apparaissait, il se formait de nouvelles tumeurs à la périphérie de l'ancienne.

En 1904, 1905 et 1906 **Anton STICKER** fit les trois communications qui ont attaché son nom à cette affection. A partir d'un Pointer qui présentait un

nodule tumoral au niveau du pénis, il transmis la maladie à plus de 80 animaux. A l'aide d'un trocard, il introduisait de petites particules tumorales d'abord sous la peau, puis dans la cavité abdominale, dans la cavité thoracique, dans le crâne et dans l'os.

Sticker obtint 60 greffes positives sous la peau du chien en 5 passages successifs. Il s'agissait surtout de nodules uniques, rarement multiples, ronds, à section blanche. Le début de la croissance a été constaté la 3e semaine après la greffe en général. Sur 21 tumeurs opérées, 13 récidivèrent dont 3 avec métastases.

Sticker inocula 61 chiens dans le péritoine, 21 furent positifs. Les greffes se développèrent, ou comme sous la peau, en noyau unique situé dans le grand épiploon et parfois atteignant le volume d'une noix de coco, ou avec formation de multiples tumeurs disséminées situées sur le grand épiploon ou sur les feuillets pariétaux et viscéraux du péritoine. Elles donnaient l'image d'une sarcomatose miliaire « einer miliaren sarkomatosis universalis ». De 12 cas qui furent autopsiés le 3e mois, 7 présentaient une sarcomatose

Un chien inoculé par voie intra-thoracique présenta 57 jours après de très nombreuses granulations des deux côtés du feuillet pariétal et des masses tumorales dans les espaces intercostaux, le médiastin, le péricarde et en arrière du rein.

De trois chiens greffés dans le scrotum tous furent positifs, l'un avec des métastases sur le cordon, au voisinage du pancréas et dans les ganglions du promontoire.

Après trépanation du tibia, Sticker implante du broyat de tumeur dans la cavité osseuse d'un animal qui meurt 92 jours après. A l'autopsie, il découvre plusieurs tumeurs de l'os, dans la synoviale de l'articulation du genou et des métastases au niveau de la rate.

La contamination des animaux par la voie digestive n'a pu être élucidée par l'auteur.

La greffe dans la cavité oculaire n'entraine que le développement d'une tumeur localisée au point d'injection ; il en est de même pour l'inoculation intracrânienne.

Enfin, ce qui est curieux, 6 chiens furent greffés sous la muqueuse du prépuce, un seul développa une tumeur.

Sticker note qu'il n'a pas observé une participation des tissus sous-jacents à la formation des tumeurs, ni dans le derme, ni dans la dissémination dans les cavités. Il y avait seulement compression des tissus voisins.

Tandis que chez 45 chiens porteurs de tumeurs cutanées, celles-ci montraient une tendance à une croissance progressive, chez 18 il y eut régression et guérison spontanée. De même dans le péritoine, 8 chiens montrèrent des tumeurs palpables, puis plus rien 15 jours après

Sticker a remarqué que l'énergie de croissance de la tumeur vénérienne ne diminue pas en dépit des passages. De plus ni l'âge, ni la parenté, ni la race n'ont d'influence sur le développement. La transmission n'est pas diminuée ni par un séjour de 14 heures à 0° C, voire même — 13° C, ni par un chauffage à 50° C pendant 2 heures. Tous les chiens qui ont été greffés avec succès se montrent plus tard immuns pour une nouvelle inoculation.

En 1905 BEEBE et EWING ont réussi des greffes à partir d'une métastase dans un ganglion inguinal d'une tumeur du fourreau. Leurs inoculations

intra-veineuses échouèrent, mais les implants sous-cutanés réussirent à prendre. Ils firent 9 passages en série. Pour ces auteurs les tumeurs croissent mieux chez les vieux chiens que chez les jeunes. Dans l'ensemble les greffes régressent après un maximum. Le point intéressant de cette expérimentation a été que les auteurs ont fait des biopsies dans les greffes à 24, 48 heures, 3, 6, 15 et 21 jours. Ils ont montré que si l'intérieur des fragments greffés se nécrosait rapidement, les cellules situées à la périphérie se mutipliaient activement et donc que la tumeur fille résultait bien de la multiplication des cellules du greffon. Les fibroblastes de l'hôte ne prennent pas part à la formation du tissu tumoral.

En 1909 HUNTER, LAW et LOEB firent des études semblables et arrivèrent aux mêmes conclusions.

En 1906, BASHFORD, MURRAY et CRAMER ont étudié de même les premiers stades de leurs greffes. Ils considèrent que les cellules tumorales inoculées dégénèrent très rapidement et que l'établissement d'une nouvelle tumeur provient de la transformation des cellules conjonctives au point d'inoculation sous l'influence d'un virus.

WADE en 1908 fit 2 groupes de passages en série, l'un de 8, l'autre de 9. Il fit des biopsies à 6, 18, 24 heures, 3, 8, 10, 15 et 21 jours. Il admet « que les tumeurs survenant après une inoculation sous-cutanée sont créées à partir des cellules introduites, certaines de celles-ci vivent et par un processus de contagion directe amènent la formation de cellules tumorales additionnelles à partir des cellules conjonctives de l'hôte ».

En 1927 MATSUBA et HIROYE réalisent des greffes de cette tumeur dans le testicule. Sur 19 animaux inoculés de cette manière 9 développèrent des tumeurs. Les auteurs ne constatèrent pas de métastases.

La même année NOVAK et CRAIG firent quelques tentatives sans succès.

En 1934 De MONBREUN et GOODPASTURE firent une série d'essais de transmission. 27 chiens reçurent des implants sous-cutanés. 5 moururent de maladie intercurrente, 17 présentèrent des tumeurs qui, après être passé par un maximum, régressèrent, 4 présentèrent des tumeurs qui crûrent. Parmi ceux-ci, 3 montrèrent des métastases soit au foie, soit à la rate et à la thyroïde, soit sous la peau. Quatre chiens inoculés dans le péritoine présentèrent des nodules intra-abdominaux, l'un d'eux avait une ascite importante. Le sédiment de 50 ml de ce fluide inoculé sous la peau de 2 chiens reproduisit des tumeurs. L'injection intra-veineuse de suspensions cellulaires produisit de nombreux petits nodules sous-cutanés. L'injection sous-cutanée de l'exsudat de tumeurs ulcérées fut négative, de même que celle du sang d'un chien porteur de métastases.

La même année STUBBS et FURTH réussirent 11 passages successifs à partir de tumeurs vénériennes. Les inoculations réussirent chez 41 de 57 chiens injectés sous la peau avec une émulsion de cellules tumorales. Les tumeurs apparurent au point d'inoculation en moyenne en 38 jours et à l'exception d'une, commencèrent à régresser après avoir atteint la taille d'une orange. Chez un chien la greffe donna des métastases cutanées sur tout le corps. Les inoculations intraveineuses produisirent une sarcomatose généralisée chez 2 chiens sur 7. Chez l'un on voyait de nombreuses masses tumorales sur la muqueuse buccale, la conjonctive, les tissus sous-cutanés, les muscles intercostaux, le cœur, le pancréas, le rein ; chez l'autre les

métastases se rencontrèrent dans les tissus sous-cutanés et le pénis. Les auteurs constatèrent une augmentation de la virulence avec le nombre des passages, ils l'attribuent au fait qu'au début ils utilisèrent des chiens âgés et par la suite des chiens plus jeunes.

En 1934 HENRY et BORY firent quelques essais de transmission.

En 1936 AJELLO utilisa des métastases cutanées apparues chez un chien atteint de polypes. Il réussit la transmission expérimentale de broyats inoculés sous la peau chez 4 chiens sur 6. Par contre, ses inoculations à la muqueuse vaginale et à la muqueuse pénienne furent négatives.

En 1950 BLOOM, PAFF et NOBACK réalisèrent des greffes qui atteignaient de la 5e à la 7e semaine une taille de 2 à 4 cm. A ce moment la peau s'ulcérait et les tumeurs se nécrosaient, puis en 3 à 8 semaines avait lieu la régression.

La même année THIERY constate que le sarcome de Sticker greffé se développe plus rapidement et de façon plus constante chez les chiens impubères que chez les adultes. La greffe de cette tumeur excite la croissance des chiens impubères conjointement avec une involution plus rapide du thymus.

En 1954 le même auteur réussit la culture « in vivo » des cellules de ce sarcome dans l'espace sous-arachnoïdien des jeunes chiens.

En 1952 KARLSON et MANN présentèrent les résultats de la plus grande expérimentation faite jusqu'à ce jour sur le sarcome de Sticker. La tumeur a été passée pendant 7 ans sur 40 passages utilisant un total de 601 chiens en 62 groupes. Parmi eux 37 chiens moururent d'autres causes. 385 des 564 chiens restants ont développé une tumeur palpable au point d'inoculation. Le pourcentage d'animaux infectés varie entre 30 et 95 % de passage à passage.

En 30 jours 37 % avaient des tumeurs palpables et 88,7 % à 60 jours. La vitesse de régression était élevée : 17 % ne duraient pas plus de 41 jours. Plus de la moitié des chiens infectés guérirent spontanément en 80 jours. Seulement 13 % des chiens gardèrent leurs tumeurs plus de 6 mois. Cinq chiens seulement présentèrent des métastases : 3 limitées aux ganglions préscapulaires, 2 sur la peau et les parotides.

Nous avons vu que WATANABE et AZUMA en 1956 ont transmis le sarcome de Sticker par injection du liquide qui sourd du pénis ou du vagin, liquide riche en cellules tumorales vivantes.

Enfin, en 1961 NIELSEN et COLE ont inoculé sous la peau et dans le péritoine des chiens ayant reçu 600 r d'irradiation totale 24 heures auparavant et par la suite 20 mg de prédnisolone les jours suivants. Ils ne constatèrent aucune prise.

III. — **TRAVAUX PERSONNELS : Obtention de souches**

Notre but dans ce travail sur les greffes du sarcome de Sticker chez le Chien a été moins d'étudier le problème propre de ces greffes, ce qui a déjà été fait maintes fois, que de créer une souche qui nous fournirait du matériel de recherche.

Il est difficile par exemple d'utiliser le sarcome de Sticker spontané sous forme de polypes de la verge ou du vagin pour des cultures de tissus,

du fait que ce matériel est souillé bactériologiquement, tandis qu'une tumeur qui s'est développée sous la peau est en principe stérile.

D'autre part la rareté de cette tumeur en Algérie nous faisait une obligation de travailler sur des chiens greffés de façon à avoir du matériel à la demande et à ne pas attendre que l'on nous présente un chien hypothétique pour pouvoir réaliser la moindre expérience.*

a) MATERIEL ET METHODE

Chiens donneurs

En l'espace de 2 ans, nous avons eu à notre disposition 3 animaux porteurs de tumeurs de Sticker des régions génitales sur lesquels nous avons pu prélever le matériel tumoral qui nous a donné les greffes.

Il s'agissait :

1° d'un griffon mâle, âgé de 4 ans, porteur de polypes de la verge et du fourreau, origine de la souche A ;

2° d'une femelle genre fox, âgée de 3 ans, atteinte de polypes du vagin, origine de la souche B ;

3° d'un mâle berger allemand, porteur de polypes de la verge, âgé de 9 ans, origine de la souche C.

Chiens receveurs

Nous avons utilisé des chiens sans origine propre en général, matériel « tout venant » en provenance de la fourrière municipale, sauf dans le cas particulier où il s'agissait de chiots qui nous ont été donnés par des propriétaires d'animaux.

Ils ont été choisis entre 1 et 5 ans, en bon état d'embonpoint et de préférence peu hargneux. Nous avons utilisé pour chaque passage des groupes de 3 ou 4, 4 étant le maximum que l'on puisse loger dans les cases du chenil de l'Intitut Pasteur d'Alger sans risques de mésentente entre les animaux.

Méthode de greffe

Lors du passage initial nous avons prélevé pour les souches A et B environ 1 ml de petits polypes, pour la souche C 4 ml. Les polypes ont été broyés aux ciseaux, lavés dans du sérum physiologique, mis en suspension dans du sérum physiologique et inoculés sous la peau du fourreau.

Pour les passages suivants nous avons dû faire l'exérèse de tumeurs développées sous la peau. Nous avons opéré sous anesthésie locale à la scurocaïne à 2 % en général adrénalinée. Une ouverture en côte de melon dégageait la surface de la tumeur ; celle-ci était énucléée en partie. Nous avons toujours laissé en place 1/4 ou 1/5 de la tumeur afin de voir son comportement ultérieur : disparition ou regain d'activité.

---

* Nous tenons à remercier notre ami le Docteur Vétérinaire POUL, ex-Chef de Service à l'Institut Pasteur d'Algérie pour la généreuse hospitalité qu'il a offerte à nos chiens et à nous-mêmes.

Pour réaliser la greffe elle-même, 4 à 8 ml de tumeur ont été prélevés, déposés dans une boîte de Petri, lavés pour les débarrasser des caillots sanguins, mis dans la presse de Fisher et broyés en purée cellulaire. Le reste du matériel tumoral, parfois jusqu'à 100 ml était conservé pour des expériences telles que cultures de tissus ou extraction d'acides nucléiques. Les examens histologiques classiques ont été faits dans la plupart des cas (55 chiens sur 107). Dans tous les autres cas, il a été fait l'examen extemporané selon la méthode du bleu de Sabrazes.

La structure homogène de cette tumeur formée de cellules tassées les unes contre les autres avec très peu de stroma conjonctif nous a permis d'obtenir en général une purée cellulaire. Nous l'avons diluée dans 10 à 15 ml de sérum physiologique ou de liquide de Hanks. L'homogénéisation se faisait à la seringue de 20 ml avec une aiguille de 20/10.

Les inoculations ont été faites sous la peau, en général dans la région du fourreau ou sur le plat de la cuisse ou sur les deux cuisses ou bien dans le péritoine. Chaque fois on a inoculé de 2 à 4 ml de suspension.

Pour des raisons matérielles nous avons dû espacer les passages et en général nous les avons faits à intervalle de trois mois.

b) RESULTATS

1. — Comportement des greffons sous-cutanés

Les inoculums ont été de 2 à 4 ml de purée cellulaire diluée dans un liquide physiologique. Le 2e et 3e jour on pouvait noter une sorte d'œdème à l'endroit de l'injection ; mais le 5e jour en général la peau était redevenue normale, on ne pouvait absolument pas reconnaître qu'une injection y avait été faite. Ceci est en conformité avec les observations de tous les auteurs qui ont pratiqué la greffe de cette tumeur. C'est la raison pour laquelle, dans nos statistiques, nous n'avons pas fait entrer en ligne de compte certains chiens morts vers le 8e ou 10e jour de maladie intercurrente. Vers le 15e-20e jour on reconnaissait à la palpation un petit nodule de la taille d'un grain de blé. Le volume du nodule croissait, formant une masse plus ou moins ovoïdale saillant sous la peau. Il atteignait la taille d'une orange vers le 4e mois. Au-delà de cette date, il était bien rare que la tumeur ne soit pas ulcérée. La tumeur ulcérée croissait encore, pour atteindre chez certains chiens 15 cm de diamètre et un poids de 1 kg (Figure 2).

Chez un faible pourcentage de nos chiens les greffes se sont révélées d'emblée négatives.

2. — Résultats numériques des greffes sous-cutanées

a. — **Souche A**

Cette souche a été notre principal instrument de travail, les autres n'étant considérées que comme souches de secours. Elle a été entretenue depuis janvier 1959 jusqu'à notre départ d'Algérie en juillet 1963.

En général nous avons fait une série unique d'inoculations par passage, sauf au 5e (12e mois) où la série s'étant révélée négative, nous en avons fait deux autres par précaution (A5c et A5d) et au 9e (24e mois) où 2 chiens sur 3 étant morts en 4 semaines nous avons fait la série de secours A9b.

A ces séries de routine s'en sont ajoutées d'autres par inoculations intra-péritonéales ou sur les chacals.

Les résultats numériques sont condensés dans les tableaux I et II.

Nous avons inoculé sous la peau 81 chiens adultes : 53 mâles et 28 femelles. Cette proportion suivant les sexes n'a pas été voulue, mais est le résultat du hasard des lots d'animaux fournis par la fourrière. 46 mâles et 21 femelles ont développé des greffes positives. Il semblerait que la proportion de mâles positifs soit plus grande que celle des femelles. Elle n'est cependant pas significative.

Nous avons également inoculé sous la peau du plat de la cuisse une série de 5 chiots âgés de 1 mois (passage A6c) 3 mâles et 2 femelles. A la fin de la première semaine une tumeur du volume d'une olive était palpable chez chacun des chiens. 3 sont morts d'ascaridiose à 15, 27 et 29 jours. A cette date la tumeur formait une masse dure, bosselée de 3 à 5 cm de diamètre suivant l'âge. Les autres sont morts de maladie de Carré à 48 et 92 jours. Les tumeurs avaient un diamètre de 8 à 12 cm. Nous avons vérifié ainsi l'idée émise par THIERY (1950), à savoir qu'un sarcome de Sticker greffé se développe plus rapidement et de façon plus constante chez les chiens impubères que chez les adultes.

Au total, pour cette souche A, 86 chiens ont été greffés sous la peau et 72 ont développé des tumeurs soit un pourcentage positif de 83,7 %. Si l'on ne tient compte que de la suite des passages en ligne directe, 64 chiens ont été greffés et 57 ont développé des tumeurs soit 89 %

b. — **Souche B**

Cette souche sera étudiée au chapitre « Greffes chez le Chacal ». Elle n'a pu être entretenue que sur 2 passages. 4 mâles et 1 femelle ont été inoculés sous la peau. Les 5 animaux ont développé des tumeurs.

Lors du second passage fait sur 3 animaux, un premier chien est mort la 3e semaine, le second atteint de rhumatismes est mort malgré un traitement à la cortisone le 3e mois, porteur d'une tumeur volumineuse, le 3e chien a subi une exérèse partielle le 60e jour, en un mois le reste de la tumeur avait régressé puis a disparu. Un chacal greffé en même temps est mort un mois après.

c. — **Souche C**

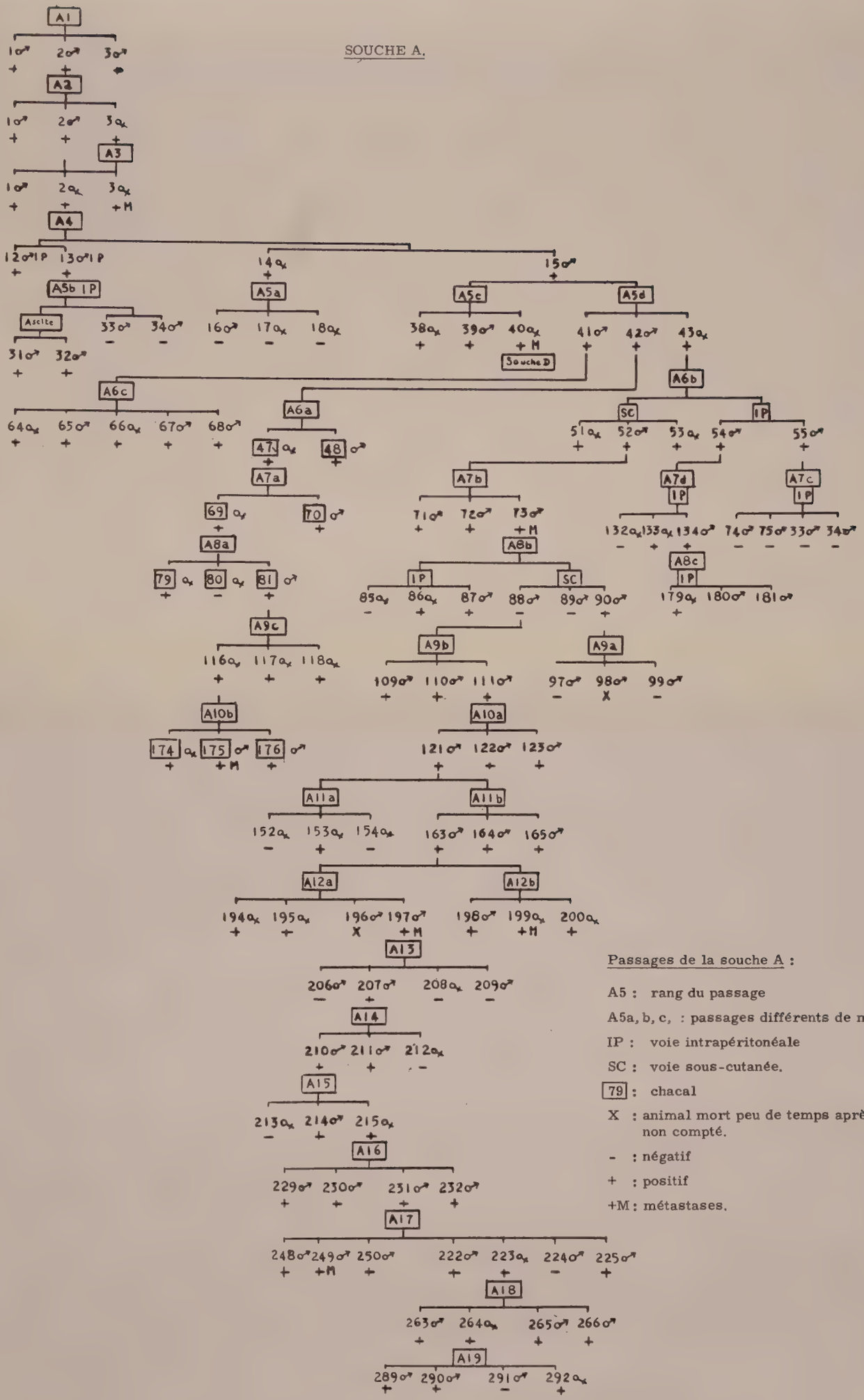
14 animaux ont été inoculés sous la peau (11 mâles et 3 femelles). 12 ont développé des tumeurs (9 mâles et 3 femelles). Nous avons fait 5 passages. Lors du 5e passage, un chien a été négatif, un autre est mort la 3e semaine, le 3e a présenté un petit nodule de 1 cm vers le 15e jour, lequel nodule est resté stationnaire pendant 7 mois. Nous l'avons sacrifié le 11e mois.

d. — **Conclusions**

Nous avons greffé au total 105 chiens, sur ce nombre 89 ont développé des tumeurs, 16 ont été négatifs (85 % de prises).

A titre comparatif nous rappelons les chiffres obtenus par les auteurs qui ont étudié la transmission du sarcome de Sticker sur un nombre relati-

SOUCHE A.



Passages de la souche A :

A5 : rang du passage

A5a, b, c, : passages différents de même rang

IP : voie intrapéritonéale

SC : voie sous-cutanée.

[79] : chacal

X : animal mort peu de temps après l'inoculation et non compté.

\- : négatif

\+ : positif

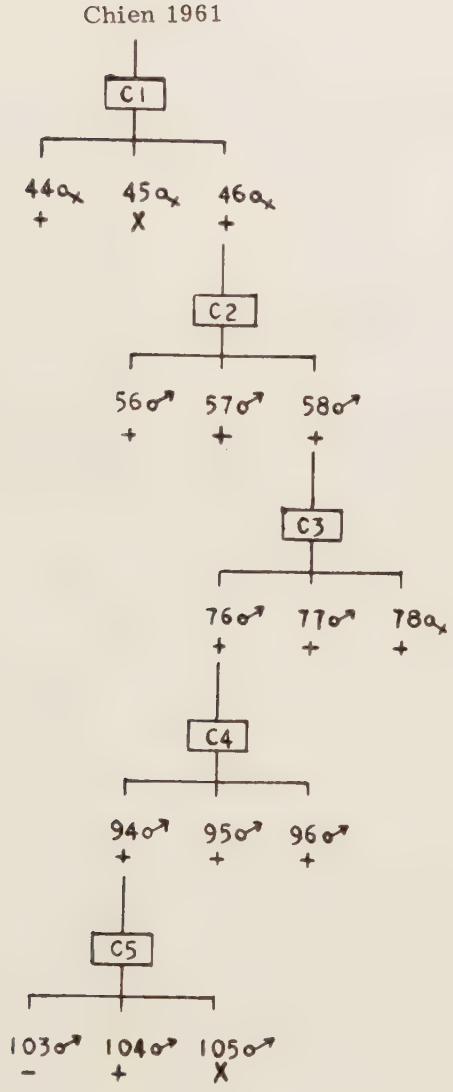
+M : métastases.

Souche A : greffe sous-cutanée chez le chien

Rang du passage	Mâles			Femelles			Chiots			Métastases
	+	—	Total	+	—	Total	+	—	Total	
I	3		3							
II	2		2	1		1				1
III	1		1	2		2				
IV	1		1	1		1				
V	3	1	4	3	2	5				1
VI	1		1	2		2	5		5	
VII	3		3							1
VIII	3		3							
IX	3	2	5	3		3				
X	3		3							
XI	3		3	1	2	3				
XII	2		2	4		4				2
XIII	1	2	3		1	1				
XIV	2		2		1	1				
XV	1		1	1	1	2				
XVI	4		4							
XVII	5	1	6	1		1				1
XVIIII	3		3	1		1				
XIX	2	1	3	1		1				
Totaux	46	7	53	21	7	28	5		5	6

Souche A : passages en ligne directe

Rang du passage	Date	Intervalle en jours	Mâles			Femelles			Synthèse		
			Total	+	—	Total	+	—	Total	+	—
1	22- 1-59		3	3					3	3	
2	29- 5-59	126	2	2		1	1		3	3	
3	23-10-59	147	1	1		2	2		3	3	
4	14- 1-60	82	1	1		1	1		2	2	
5	31- 3-60	76	2	2		1	1		3	3	
6	19- 5-60	59	1	1		2	2		3	3	
7	20- 7-60	62	3	3					3	3	
8	13- 9-60	55	3	3					3	3	
9	29-12-60	107	3	3					3	3	
10	24- 3-61	85	3	3					3	3	
11	28- 7-61	126	3	3					3	3	
12	28-10-61	92	1	1		2	2		3	3	
13	12- 1-62	76	3	1	2	1		1	4	1	3
14	17- 4-62	95	2	2		1		1	3	2	1
15	19- 6-62	63	1	1		2	1	1	3	2	1
16	5- 9-62	78	4	4					4	4	
17	7-12-62	93	6	5	1	1	1		7	6	1
18	4- 2-63	59	3	3		1	1		4	3	
19	23- 5-63	108	3	2	1	1	1		4	3	1
Totaux			48	44	4	16	13	3	64	57	7



SOUCHE C

Même légende que pour la souche A.

vement important d'animaux (compte tenu qu'il s'agit de chiens et non de souris) :

STICKER a eu 60 chiens positifs sur 91 inoculés sous la peau, soit 66 %.

STUBBS et FURTH ont eu 41 chiens positifs sur 57 inoculés, soit 71 %.

KARLSON et MANN ont eu 385 chiens positifs sur 564 inoculés, soit 68 %.

3. — Rechutes et régressions

En règle générale, lorsque nous avons eu à prélever du matériel sur une tumeur greffée, nous n'avons jamais fait l'exérèse totale de la tumeur, comme nous aurions procédé dans un but thérapeutique, mais nous avons toujours laissé en place le 1/4 ou le 1/5 de la tumeur avec sa vascularisation. N'étant pas riche en animaux, notre but était, en espérant une rechute, de conserver un animal donneur de matériel. Dans la souche A ,31 chiens ont été opérés pour des raisons diverses. 29 ont rechuté. En l'espace de 1 à 2 mois la tumeur avait repris son volume primitif. Dans 2 cas il y eut disparition du reliquat resté en place. STICKER note que sur 21 tumeurs sous-cutanées opérées, 13 ont récidivé, mais il ne dit pas si l'exérèse avait été totale ou partielle.

Parmi les greffes sous-cutanées de la souche A soit 72 sur 86 animaux, nous n'avons constaté que 5 cas de régression.

Chien 51 femelle, passage A6b du 15-5-1960, subit une exérèse partielle le 19-8. 6 mois après la tumeur avait disparu.

Chien 109 mâle, passage A9b du 29-12-1960, un mois après la tumeur était très nette, 7 mois après elle avait disparu.

Chien 195 femelle, passage A12a du 28-10-1961, donne naissance à des chiots 1 mois après. La greffe lente à démarrer n'est positive que le 4e mois. Nous l'avons sacrifiée le 10e mois, la tumeur ayant disparu.

Cas des chiennes 116 et 117, passage A8e à partir d'un chacal le 4-3-1961.

116 — Présente le 19-8 une grosse tumeur ulcérée, son exérèse partielle sert à greffer 2 chacals. Un an après la tumeur avait disparu.

117 — La tumeur s'est développée jusqu'en juillet, puis en août a commencé à diminuer. Il n'y a pas eu d'exérèse. Comme 116, la tumeur a disparu un an après.

Dans la souche B au 2e passage, le chien N° 6 a subi une exérèse partielle le 60e jour, en l'espace d'un mois le reste de la tumeur avait disparu.

Dans la souche C, sur 14 chiens, 12 ont été positifs, il y a eu 1 cas de régression :

Chien 104, 5e passage du 20-12-1960 a présenté un petit nodule de 1 cm le 15e jour. Ce nodule est resté stationnaire pendant 7 mois, puis a diminué de volume. Nous l'avons sacrifié le 11e mois, il ne restait en place qu'un petit nodule de la taille d'une lentille.

La plupart des auteurs qui ont pratiqué la greffe du sarcome de Sticker sont d'accord sur le fait que ces tumeurs après être passées par un maximum, atteint rapidement en 3 à 4 mois, régressent en 1 à 3 mois sou-

vent dans la totalité des cas. STICKER (1906) a constaté 18 cas de régression et de guérison spontanée sur 63 chiens à tumeur. KARLSON et MANN (1952) qui ont utilisé un grand nombre d'animaux constatent que 13 % seulement des chiens conservent leurs tumeurs plus de 6 mois.

Nous n'avons pas pu garder pendant de longues durées nos chiens en captivité. Le régime alimentaire défectueux, la claustration, l'hiver, ont fait que 3/5 de nos animaux n'ont pas dépassé 6 mois. STICKER a eu des conditions analogues : « Les plus longs temps d'observation des tumeurs primaires vont de 4 à 5,5 mois. De 42 chiens avec des tumeurs primaires, seuls 13 vécurent plus de 3 mois. Les plus longs temps d'observation des chiens avec récidive vont de 6,5 à 8 mois. »

Le 1/5 seulement de nos chiens a vécu plus de 10 mois dans la souche A. Nous n'avons constaté dans ce groupe que 2 cas de régression avec disparition de la tumeur.

Il est difficile de dire quel aurait été le comportement de tous ces chiens s'ils avaient vécu plus d'un an après l'inoculation. Cependant, par rapport aux travaux antérieurs nous constatons que dans l'ensemble nous avons observé le plus petit nombre de cas de régression.

4. — Métastases

Nous nous sommes particulièrement intéressé aux cas de métastases de nos greffes sous la peau. Dans la souche A, sur 86 chiens inoculés, 72 ont donné des greffes positives, 6 ont présenté des métastases, soit 8,5 %. Tous nos chiens ont été autopsiés sauf les derniers que nous avons abandonnés à notre départ d'Algérie.

Description des cas cliniques

1. — Chien A2/C second passage, femelle inoculée le 29-5-1959, a subi l'exérèse d'une partie de la tumeur pour donner le passage A3 le 23-10. Elle meurt le 16-11-1959 soit environ 6 mois après l'inoculation. Une nouvelle tumeur s'est reformée à l'emplacement de la greffe initiale. Nous trouvons de nombreux nodules sous-cutanés et dans le foie.

2. — Chien 40 femelle, inoculée le 10-3-1960 (5e passage), sacrifiée le 12-9-1960, 6 mois après. Elle présente une énorme tumeur ulcérée dans la région antévulvaire au point d'inoculation, un nodule métastique sur la cuisse gauche de 2 × 3 cm. En plus de nombreux nodules sous-cutanés sont répandus sous la peau des côtes, des épaules et en avant de la trachée. A l'intérieur les ganglions du promontoire sont atteints.

3. — Chien 73, mâle inoculé le 20-7-1960 (7e passage) sacrifié le 7-3-1961, 7 mois et demi après. Présente une énorme tumeur au point d'inoculation, de 20 × 11 × 10 cm, nécrosée en son centre. Entre la tumeur et les muscles des cuisses de nombreux petits nodules sphériques de 1/2 à 1 cm. Nombreux nodules sous-cutanés dorsaux. Foie truffé de métastases de 2 à 3 cm. (Figure 3).

4. — Chien 197, mâle inoculé le 28-10-1961 (passage A12a) sur le plat des deux cuisses. Opéré partiellement le 76e jour donne le 13e passage. Deux mois plus tard présente 2 grosses tumeurs. La plaie de la tumeur opérée s'est cicatrisée, celle-ci a rattrapé le volume de la tumeur laissée intacte. L'animal meurt le 10-4-1962, le 5e mois.

A l'autopsie on voit des métastases dans les ganglions du promontoire et dans le foie.

5. — Chien 199, femelle inoculée le 1-12-1961 sur le plat des cuisses, passage A12b. Quatre mois plus tard présente 2 tumeurs grosses comme des mandarines sur les cuisses. Meurt le 14-8-1962. Les tumeurs sont nécrosées en leur centre. A l'autopsie on voit des métastases dans les ganglions du promontoire, rien au foie.

8. — Chien 249 mâle inoculé le 7-12-1962 sur le fourreau et la cuisse. Meurt 4,5 mois après, avec une grosse tumeur sur le fourreau (10 × 8 × 6 cm), une plus petite sur la cuisse droite. A l'autopsie on note la présence de métastases hépatiques, rien dans les ganglions.

Au total, chez 3 mâles et chez 3 femelles des métastases sont apparues entre 4 et 6 mois après l'inoculation.

Il y a eu dans 3 cas des métastases cutanées.

— 4 — dans le foie.

— 3 — dans les ganglions.

Au point de vue macroscopie les ganglions présentaient une hypertrophie atteignant parfois 10 cm de diamètre en 2 ou 3 masses lobulées. Dans le foie on voyait des nodules de 2 à 3 cm de diamètre en général, atteignant parfois 5 à 6 cm. Ils saillaient légèrement sous la capsule et s'enfonçaient dans le parenchyme.

Les nodules cutanés étaient de petites masses discoïdales plates, de 1 à 2 cm de diamètre, 4 à 5 mm de hauteur, adhérentes à la peau, mobiles sur les plans profonds. Leur vitesse d'apparition était rapide. Quand on percevait 2 ou 3 nodules à la palpation, dans la semaine qui suivait le nombre en passait à 10-15, pour doubler la semaine suivante.

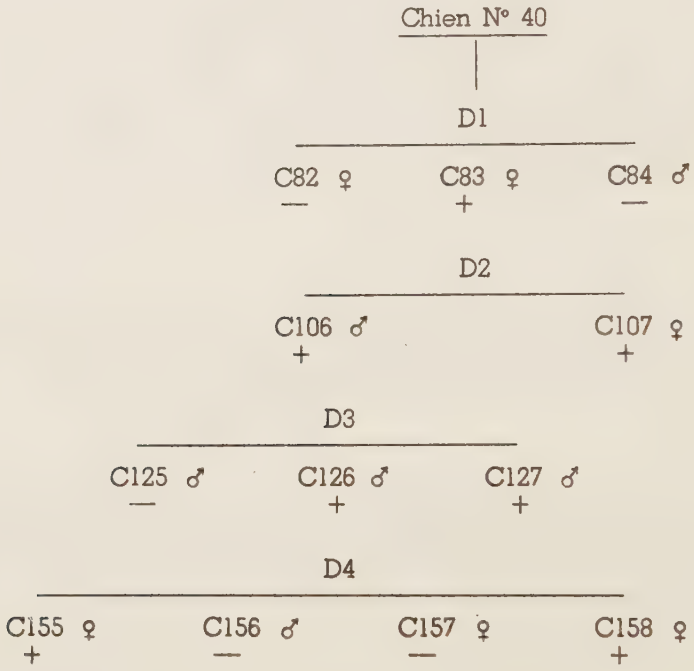
Nous ne pensons pas qu'il y ait corrélation entre la durée de survie de l'animal et l'aptitude à donner des métastases. Celles-ci n'apparaissent pas d'emblée, il faut évidemment un certain temps entre la greffe et la dispersion dans l'organisme, mais chez nos chiens les métastases sont apparues entre 4 et 6 mois. Nous avons gardé des animaux pendant plus d'un an, voire un chacal pendant 23 mois. Certaines des tumeurs avaient la taille d'une orange. Elles étaient restées stationnaires. A l'autopsie il n'y avait pas de métastases.

5. — Greffe des métastases

Nous avons cherché à savoir si les métastases et plus particulièrement les métastases cutanées étaient capables d'être greffées. Pour cela nous avons créé une nouvelle souche (D) à partir du chien 40.

Comme nous l'avons vu plus haut, ce chien présentait, en plus d'une grosse tumeur au point d'inoculation, des métastases cutanées. Nous avons prélevé aseptiquement 6 de ces nodules, ce qui représentait environ 7 à 8 ml. Nous les avons broyés à la presse de Fischer, dilués dans le liquide de Hanks et inoculés sous la peau de 3 chiens. Un seul donna une tumeur.

Le schéma suivant montre la suite des passages :



Lors du 4e passage, 2 chiens 156 et 157 moururent à 3 semaines et 1 mois négatifs. Le chien 155 présenta une tumeur comme une noix vers la 6e semaine, le 3e mois elle avait complètement disparu. Le chien 158 a développé lentement une tumeur qui avait la taille d'une noisette le 3e mois. En janvier 1962 lors d'une réduction de notre effectif, faute de nourriture, nous l'avons sacrifié et la souche avec.

Sur 12 chiens inoculés, 7 ont développé des tumeurs. Trois d'entre elles ont été volumineuses, l'une formée même de plusieurs nodules de 3 à 4 cm de diamètre confluents, mais distincts. Trois avaient un plus petit volume, une grosse noix par exemple. Une enfin a régressé.

Les métastases cutanées des greffes sont donc susceptibles d'être greffées en série.

6. — *Greffes intrapéritonéales*

Nous nous sommes adressé au péritoine comme lieu d'inoculation non seulement parce que c'est une voie qui mérite d'être tentée, mais surtout parce que nous pensions par ce moyen créer une tumeur ascite.

Expérience 1 :

Le chien N° 2 du 3e passage de la souche A nous a fourni le matériel tumoral que nous avons inoculé dans le péritoine des chiens 12 et 13.

Le chien 12 meurt un mois après. A l'autopsie on distingue un nodule au point de de passage de l'aiguille entre la peau et les muscles abdominaux. Tout l'abdomen est constellé de centaines de petits nodules de 1 à 10 mm appendus sur le mésentère, l'épiploon et le péritoine pariétal. L'ascite contient des éléments néoplasiques libres. (Figure 4).

Le chien 13 est sacrifié le 50e jour. Il présentait une ascite volumineuse. A l'ouverture on avait le même aspect que chez le chien précédent. L'épiploon pesait plus d'un kilog.

Expérience 2 :

On recueille aseptiquement 40 ml du liquide d'ascite du chien précédent (10.10^6 cellules tumorales par ml) et on les inocule dans le péritoine de deux chiens 31 et 32.

De plus 10 ml de nodules tumoraux sont broyés et inoculés de la même manière chez 2 chiens 33 et 34.

Les chiens inoculés avec le broyat de tumeurs sont négatifs.

Le chien 31 inoculé avec le liquide d'ascite a été sacrifié le 4e mois. On voyait un petit nodule sur le péritoine et deux gros en avant des bourses dans la vaginale.

Le chien 32 de même présentait une grosse tumeur de forme oblongue de $10 \times 6 \times 6$ cm le long du fourreau. Dans l'abdomen, il n'y avait pas trace de tumeur.

Dans ces deux cas le liquide d'ascite a bien redonné des tumeurs, mais pas d'ascite.

Expérience 3 :

Le chien 43 (passage A5d) sert à inoculer 2 chiens 54 et 55.

Le chien 55 est sacrifié à 62 jours. On constate une sarcomatose de l'abdomen.

On prélève 100 ml d'ascite et 100 ml de nodules tumoraux que l'on broie et l'on inocule le mélange broyat + liquide d'ascite dans l'abdomen de 2 chiens neufs et de 2 chiens réfractaires de l'expérience 2.

Tous les animaux se révèlent négatifs.

Le chien 54 est sacrifié le 11e mois. Une énorme tumeur a envahi le scrotum, on note un nodule au point d'inoculation et une tumeur grosse comme le poing enserrant une anse intestinale, rien sur l'épiploon.

Expérience 4 :

La tumeur située sur l'intestin du chien précédent sert à inoculer 3 chiens : 132, 133 et 134.

Le chien 132 est sacrifié le 11e mois, négatif.

Le chien 133 est sacrifié le 16e mois, porteur d'un nodule sous-cutané au point d'inoculation.

Le chien 134 est sacrifié le 4e mois, il présente une sarcomatose abdominale.

Expérience 5 :

On prélève chez le chien précédent 10 ml de grappe de nodules que l'on inocule avec le liquide d'ascite chez 3 chiens.

Un seul de ces chiens va présenter un nodule sous-cutané au point d'inoculation.

Expérience 6 :

Nous avons fait encore un autre passage (A8b) sur des chiens porteurs de microfilaires.

Sur 3 chiens, un seul a présenté une sarcomatose de l'abdomen avec ascite le 3e mois. Ayant fait l'autopsie le lendemain de la mort, nous n'avons pu l'utiliser. Un second chien présentait un nodule au point d'inoculation.

Au total, sur 19 animaux inoculés, 11 se sont révélés positifs. Comme l'avait remarqué STICKER, ces greffes se présentent sous deux formes : ou bien en gros nodules solitaires sans ascite (6 cas) ou bien en innombrables petits nodules avec ascite (5 cas).

Le premier passage tumeur cutanée-péritoine (1, 3 et 6) a donné des images d'ascite avec sarcomatose péritonéale, mais l'ascite réinoculée a donné des tumeurs localisées. Une tumeur localisée dans l'abdomen peut redonner une sarcomatose (4).

STICKER avait également remarqué que des chiens inoculés dans le péritoine présentaient des tumeurs palpables, puis en 10 à 15 jours celles-ci disparaissaient. Nous n'avons jamais rencontré cette régression malgré un examen soigneux des animaux.

Nous n'avons pas réussi à créer une souche de tumeur-ascite. Nous pensons cependant que la transformation est possible, car dès le départ ,les conditions sont réalisées : de nombreuses tumeurs intra-abdominales avec une ascite contenant des éléments néoplasiques ; mais pour cela il faudrait comme pour la création des tumeurs-ascites des Rongeurs, pouvoir utiliser un grand nombre de chiens et faire une sélection. Le résultat pourrait être très intéressant sur le plan pratique.

Tableau récapitulatif des greffes du sarcome de Sticker chez le chien

Souche	Voie	Total des greffes	Chiens positifs	Régressions	Métastases
A	SC	86	72	5	6
	IP	19	11		
B	SC	5	5	1	
C	SC	14	12	1	
D	SC	12	7	1	
Totaux		136	107	8	6

Note : SC = sous-cutanée
IP = intra-péritonéale

c) **DISCUSSION**

Nous avons vu que le sarcome de Sticker a été greffé chez le Chien

suivant les voies les plus diverses. Nous nous sommes limité à la peau et au péritoine avec des buts bien définis : dans un cas, assurer une souche permanente et maniable ; dans l'autre, essayer de créer une tumeur-ascite

Des chiens sans origine définie, nés et élevés en Algérie ont été inoculés. Au total 107 sur 136 ont développé des tumeurs analysées histologiquement soit 79 %. Par rapport aux chiffres présentés par les auteurs antérieurs nous sommes en droit de considérer que nous avons obtenu le plus fort pourcentage de greffes positives.

La souche de tumeurs greffées sous la peau que nous avons entretenue pendant plus de 4 ans a conservé sa virulence sans atténuation.

L'image histologique des tumeurs greffées est identique à celle de la tumeur d'origine (Figures 11 et 13).

Certaines tumeurs après avoir atteint un maximum de taille ont régressé et disparu. Le pourcentage de ces régressions est faible (7,5 %). Des auteurs tels que STICKER, De MONBREUN et GOODPASTURE ont constaté que des chiens dont la tumeur greffée avait régressé, étaient résistants à une nouvelle inoculation. Ils en ont conclu à l'établissement d'une immunité chez l'animal. Nous n'avons pas abordé ce problème.

Certains chiens ont présenté des métastases et en particulier des métastases d'un type spécial ayant la forme de petits nodules cutanés multiples. Ces nodules greffés à leur tour ont permis de réaliser quatre passages.

B. — TRANSMISSION EXPERIMENTALE DU SARCOME DE STICKER DU CHIEN AU CHACAL

De nombreux auteurs ont essayé de transmettre le sarcome de Sticker à d'autres espèces animales. Le premier, STICKER, réussit en 1905 à greffer la tumeur qui porte son nom au Renard. A partir d'un Pointer présentant un nodule tumoral au niveau du pénis, il obtint des greffes positives chez 2 renards : chez un jeune sous la peau et chez un vieux mâle en même temps sous la peau et dans le péritoine.

WADE, en 1908 a réussi également à greffer 2 jeunes renards sous la peau.

Dans un même ordre d'idée, nous avons fait une expérience analogue mais en nous adressant non plus au Renard **Vulpes vulpes,** mais au Chacal d'Afrique du Nord **Canis aureus.**

a) MATERIEL ET METHODE

Animaux

Des chacals capturés dans la région algéroise nous ont été fournis gracieusement par le Parc Zoologique du Jardin d'Essai d'Alger. Ils étaient en

général jeunes, nés du printemps et avaient donc de 3 à 5 mois au moment de l'expérience. Dans 2 cas seulement nous avons eu des animaux plus âgés, un mâle de l'année précédente et une vieille femelle à dentition usée.

Matériel d'inoculation

Dans une première expérience un chien femelle porteur de polypes du vagin (1918 PC) a fourni le matériel d'inoculation.

Dans une deuxième le matériel a été prélevé sur le chien 42 (5e passage de notre souche A).

La technique utilisée a été la même que pour les greffes chez le Chien.

Schéma des expériences

Expérience 1 : Sarcome de Sticker naturel

|

Chien + Chacal

|

Chien + Chacal.

Expérience 2 : Sarcome de Sticker greffé chez le Chien

|

Chacal

|

Chacal

|

Chacal

|

Chien

|

Chacal

b) RESULTATS

Les résultats généraux sont donnés dans les tableaux 1 et 2.

1. — Dans la première expérience faite avec une tumeur de Sticker naturelle, les inoculations ont été pratiquées sous la peau de la côte gauche de 2 chiens adultes et d'un jeune chacal femelle âgé d'environ 3 mois. Les greffes ont été longues à se manifester et l'on a noté des abcès aux points d'inoculation des chiens et chacal. Après cicatrisation, de petites

tumeurs sont apparues vers le deuxième mois chez les chiens. Leur croissance s'est poursuivie jusqu'à la mort des animaux.

Chez le chacal une tumeur se développa au point d'inoculation vers le 3e mois. Le 5e mois on pouvait voir une grosse tumeur de 5 × 4 × 4 cm au flanc gauche de celui-ci, plus 2 nodules plus petits de 2 cm un peu plus loin et une masse tumorale grosse comme un petit œuf dans la région périnéale.

Le chacal est mort à la fin du 5e mois. A l'autopsie le foie s'est révélé criblé de métastases, petits nodules de 2 à 10 mm de diamètre.

Trois semaines avant la mort on prélève aseptiquement deux nodules métastatiques en avant de la vulve et on inocule 3 chiens sous la peau du fourreau. Tous développeront des greffes positives.

Une semaine après cette greffe, un autre nodule est prélevé. 5 ml sont broyés et inoculés sous la peau d'un chacal mâle âgé de 7 mois environ au flanc gauche et au fourreau.

L'animal meurt 3 semaines après avec des nodules de 1 cm.

2. — Dans la seconde expérience nous avons inoculé 2 chacals sous la peau dans la région génitale à l'aide du broyat d'une tumeur greffée chez le chien. Il s'agissait d'un mâle d'un an et d'une femelle beaucoup plus âgée (Nos 48 et 47).

Les deux animaux ont développé rapidement des tumeurs.

Passage 2. — Le 50e jour la femelle C47 présentait une grosse tumeur de 7 × 5 × 5 cm. On fait l'exérèse, le broyat et l'inoculation dans la région inguinale de 2 jeunes chacals nés du printemps, une femelle C69 et un mâle C70.

Passage 3. — Le 50e jour également la femelle C69 qui présente une tumeur de 8×6×6 cm est opérée et sert à inoculer 3 chacals 79, 80 et 81.

La femelle 69 mourra deux mois plus tard avec des métastases hépatiques.

La femelle 79 saute par la fenêtre de notre laboratoire le 15e jour et se tue. Elle porte un nodule tumoral de 1 cm.

La femelle 80 meurt le 20e jour négative.

Le mâle 81 sera sacrifié 25 mois plus tard porteur d'une tumeur de 15 cm. L'autopsie ne révèlera pas de métastases.

Passage 4. — Sept mois après avoir été greffé le mâle 81 sert à inoculer 3 chiennes 116, 117 et 118. Les 3 chiennes seront positives mais les tumeurs de 116 et 117 vont régresser par la suite.

Passage 5. — Au bout de 6 mois la chienne 116 présente une grosse tumeur ulcérée. On prélève la partie saine et l'on greffe 3 chacals nés du printemps, 174, 175 et 176. Les trois animaux seront positifs. Le chacal 175 meurt le 24 mars 1962, soit 8 mois plus tard porteur de métastases de la peau, du foie et de la rate. Les événements d'alors ne nous ont pas permis de continuer l'expérience.

Expérience 1

Ordre des passages	Donneurs	Nombre des Chiens	Survie des Chiens	Résultats	Nombre des Chacals	Survie des Chacals	Résultats
1	Sarcome de Sticker naturel	2	3,5 mois 4 mois	+ +	1	5 mois	Métastases
2	Chacal	3	0 5 mois 2 mois 12 mois	+ + +	1	21 jours	+

Expérience 2

Ordre des passages	Donneurs	Nombre des Chiens	Survie des Chiens	Résultats	Nombre des Chacals	Survie des Chacals	Résultats
1	Sarcome de Sticker greffé				2	3 mois 5 mois	+ +
2	Chacal				2	1,5 mois 4 mois	+ Métastases
3	Chacal				3	15 jours 20 jours 23 mois	+ — +
4	Chacal	3	6,5 mois 12 mois 12 mois	+ + +			
5	Chien				3	1 mois 2 mois 7 mois	+ + Métastases

c) DISCUSSION

1. — De ce qui précède nous pouvons voir que le Sarcome de Sticker qu'il soit naturel ou qu'il soit greffé chez le Chien est transmissible par greffe au Chacal (Figure 5).

On peut passer du Chien au Chacal, puis du Chacal au Chien et revenir au Chacal sans diminuer la potentialité de la tumeur.

Sur 12 animaux inoculés, 11 ont donné des greffes positives. Le seul animal que nous considérons comme négatif est mort 3 semaines après avoir été greffé. Il est possible que s'il avait survécu, il eut été positif.

A première vue la croissance semble plus rapide que chez le Chien : le 15e jour on observe des nodules de 1 cm à l'endroit de la greffe. Mais dans 10 cas nous avons eu affaire à des animaux âgés de 3 à 5 mois et chez le jeune Chien aussi la croissance des tumeurs est plus rapide. Cependant dans les 2 cas restants il s'agissait d'animaux âgés de un an et plus.

Sur les 5 Chacals qui ont survécu plus de 3 mois, 3 se sont révélés porteurs de métastases sur le foie ou la peau ou les deux, voire sur la rate (Figure 6). Cette proportion nous semble significativement plus importante que chez le Chien. Cependant comme chez le Chien ces animaux sont morts entre le 4e et le 7e mois. Nous avons gardé un chacal 23 mois, la tumeur qu'il portait est restée stationnaire pendant plus d'un an.

Les métastases cutanées du Chacal peuvent être greffées avec succès chez le Chacal et le Chien.

Au point de vue anatomo-pathologique rien ne permet de faire une distinction entre les greffes chez le Chien ou chez le Chacal.

2. — Le Chacal se révèle donc un excellent récepteur pour le sarcome

de Sticker. Celui-ci est rare en Algérie. Le Chacal est un animal peureux ; les contacts qu'il peut avoir avec un Chien ne peuvent résulter que d'un combat, en tout cas on conçoit mal un Chien montant une femelle Chacal ou l'inverse. On peut admettre que cette population Chacal isolée dans l'île du Maghreb cernée par la mer et le Sahara n'a jamais été en contact avec cette maladie. Si l'on admet que les cellules de la tumeur de Sticker hébergent un virus oncogène, il est normal que celui-ci ait trouvé un terrain de choix sur une espèce sœur et indemne de tout contage.

Nous regrettons que les circonstances particulières propres aux évènements d'Algérie de ces dernières années ne nous aient pas permis d'expérimenter sur le Fenech, renard du désert. Il nous a été pratiquement impossible de nous en procurer. Nous pensons que nous aurions obtenu des résultats identiques avec cette espèce.

C. — LA GREFFE HETEROLOGUE DU SARCOME DE STICKER

Nous avons vu que STICKER puis WADE ont greffé le sarcome vénérien du Chien au Renard. Nous-mêmes l'avons greffé chez le Chacal. Nous allons étudier maintenant la greffe de cette tumeur chez les petits animaux de laboratoire.

I. — TRAVAUX ANTERIEURS

Quelques expérimentateurs ont essayé de transmettre le sarcome de Sticker chez les Rongeurs.

STICKER en 1905 s'efforça de transplanter cette tumeur chez le Chat, Lapin, Cobaye, Rat et la Souris. Ses efforts furent infructueux.

WADE en 1908 inocula des lapins, rats et cobayes. Dans tous les cas les fragments introduits subirent une dégénérescence graduelle et disparurent.

MATSUBA et HIROYE en 1927 inoculèrent dans le testicule de 30 rats et de 10 lapins de 0,5 à 1 ml de broyat de tumeur. Tous les résultats furent négatifs.

STUBBS et FURTH en 1934 entreprirent une série d'expériences d'allure moderne en essayant de transmettre la tumeur à des souris irradiées.

Dans un premier essai 9 souris furent exposées 4 jours auparavant à 400 r, puis reçurent sous la peau une émulsion de tissu tumoral. Les souris tuées pour la plupart une dizaine de jours après l'inoculation laissèrent voir des cellules tumorales vivantes dont certaines en mitose au point d'inoculation.

Dans une autre expérience 11 souris furent irradiées 1 jour avant d'être inoculées : 8 sous la peau, 3 dans le péritoine. Chez 3 souris inoculées sous la peau, une tumeur atteignit la taille de 2 mm chez l'une, 4 mm chez les deux autres. Le reste des souris inoculées sous la peau et toutes celles par voie intrapéritonéale furent négatives. Cinq des souris ainsi traitées furent observées sur une période de 2 mois et à l'autopsie ne montrèrent pas de traces de tumeur.

Pour les auteurs « ces observations montrent que les cellules du sarcome vénérien peuvent survivre et se multiplier pour une période d'environ 9 jours dans le tissu sous-cutané de souris dont la résistance a été abaissée par exposition aux rayons X, mais qu'ensuite elles régressent et disparaissent ».

Dans un autre domaine en ce qui concerne les greffes intraoculaires, nous n'avons à notre connaissance que trois essais de transmission de tumeur canine.

LUSBAUGH et STEINER en 1949 inoculèrent par cette méthode des cobayes et des lapins avec un lymphome ayant causé une grosse hypertrophie de tous les ganglions lymphatiques, de la rate et du foie chez un Cocker-spaniel de 2 ans. Ils utilisèrent 4 cobayes et 4 rats. Aucune prise n'eut lieu.

En 1951 TOWBIN a greffé avec succès un fibro-sarcome rétro-péritonéal canin.

MOHIYUDDEEN et COLE en 1952 réussirent à transplanter 4 tumeurs canines différentes dans la chambre antérieure de l'œil du cobaye. Un total de 41 transplants de différentes tumeurs furent faits chez 241 cobayes. Ils consistaient en 25 tumeurs malignes, 10 embryonnaires et 6 bénignes. Les tumeurs du chien qui réussirent à croître furent un ostéo-sarcome, un mélanome, un adéno-carcinome sébacé et un séminome.

II. — **TRAVAUX PERSONNELS**

Nous avons fait des greffes de sarcome de Sticker chez les Rongeurs en employant d'une part des fragments de tumeur, d'autre part des cellules trypsinées de la même tumeur.

a) MATERIEL ET METHODE

Animaux :

Nous avons utilisé des lapins, rats, souris et cobayes sans spécificité de race provenant de l'élevage de l'Institut Pasteur d'Algérie. Les hamsters syriens provenaient de la même source.

Tumeurs :

Nous avons utilisé des tumeurs de Sticker de notre souche A greffée chez le Chien.

Méthode :

1° Un fragment de tumeur est prélevé aseptiquement, lavé dans le liquide de Hanks puis découpé en petits fragments de 1/2 mm de côté. Avec une aiguille nous avons monté 3 à 4 fragments sur une aiguille à ponction lombaire en reculant le manchon de 1/2 cm, ceci pour les rats. Pour inoculer les souris nous avons utilisé une aiguille à injection de 7/10 dont nous avons limé le biseau à 45°. Les animaux sont anesthésiés au Nesdonal dans le péritoine.

Cas des Rats et des Souris. — Les animaux endormis sont couchés sur le côté droit. On coupe aux ciseaux les vibrisses. Une pression du pouce et de l'index fait sortir l'œil de

l'orbite. L'œil est lavé avec une solution de Cétavlon dilué au 1/4 avec du sérum physiologique. On dépose sur l'œil 2 gouttes de Novocaïne à 1 %. Avec une aiguille lancéolée on fait une incision dans la moitié supérieure de la cornée, une goutte d'humeur acqueuse sourd. L'aiguille chargée est introduite dans la chambre antérieure, on pousse le mandrin et les fragments se répandent dans la chambre. L'œil est recouvert de pommade ophtalmique à l'auréomycine.

Cas des Cobayes et des Lapins. — Après désinfection et Scurocaïne, on pince la conjonctive avec une petite pince de Kocher ; l'œil est ainsi immobilisé. L'incision et l'inoculation sont identiques au cas précédent.

2° Un autre morceau de la même tumeur est coupé en fragments de 5 mm, trypsiné 30 minutes; on jette le surnageant, on trypsine à nouveau 1 à 2 heures. On lave 3 fois. Le culot est repris avec son volume de liquide de Hanks.

Pour inoculer les cellules dans la chambre antérieure de l'œil nous avons employé 2 modes d'introduction :

— Cas des Cobayes : Seringue à insuline (1/40 de ml).

— Cas des Rats et des Souris : Une pipette Pasteur à extrêmité effilée et munie d'un capuchon de compte-gouttes en caoutchouc

3° **Inoculation intra-cérébrale.** — Nous avons utilisé une seringue à insuline avec une aiguille de 4/10. La dose de cellules trypsinées a été de 1/80 ml pour les Souris, de 1/40 ml pour les Rats.

4° **Cas des Hamsters.** — L'animal est endormi; la poche jugale est extirpée à l'aide d'une pince sans mors. L'index est passé sous la poche de façon à la tendre. La poche est désinfectée avec du Cétavlon. Dans le cas de l'inoculation des fragments nous avons employé l'aiguille à ponction lombaire; dans le cas des cellules trypsinées, la seringue à insuline (1/5 de ml).

En même temps que les Hamsters recevaient une inoculation de tumeur, ils recevaient 3 mg de cortisone sous la peau de l'aine. Ils recevaient la même dose 8 jours après.

5° **Contrôle de technique.** — Dans le but de contrôler la technique d'inoculation des cellules trypsinées, nous avons inoculé la tumeur-ascite d'Ehrlich dans l'œil et le cerveau du Rat et dans l'œil du Cobaye.

EXPERIENCES

Les tableaux suivants résument les expériences :

A. — **Greffe de fragments de sarcome de Sticker**

Espèce	Œil	Poche jugale
Rat	39	
Souris	27	
Cobaye	10	
Lapin	6	
Hamster		13

B. — **Sarcome de Sticker trypsiné**

Espèce	Œil	Cerveau	Peau	Poche jugale
Rat	55	11		
Souris	51	21		
Souriceau			23	
Hamster				20
Cobaye	17			

C. — **Tumeur-ascite d'Ehrlich**

Espèce	Œil	Cerveau
Rat	14	12
Cobaye	6	

b) RESULTATS

1° Greffes intra-cérébrales

Les résultats ont été négatifs. Sur les coupes histologiques d'encéphales de rats et de souris, on suit le trajet de l'aiguille par une cicatrice rectiligne avec des restes d'hémorragie, mais sans trace de multiplication des cellules, ni des cellules tumorales elles-mêmes.

2° Greffes intra-oculaires

La cicatrisation de la cornée a été parfaite, nous n'avons pas eu d'ophtalmie. Quelques souris ont présenté une kérato-conjonctivite qui a cédé en quelques jours avec la pommade ophtalmique. La transparence de la cornée nous a permis de suivre le devenir des produits inoculés.

a) Greffe des fragments

Lapins et cobayes. — Les fragments persistent assez longtemps dans la chambre antérieure de l'œil sans augmenter de taille. Ils sont blancs, en général en position inférieure entre la cornée et l'iris. Ils finissent par disparaître, l'œil redevient intact, le fond d'œil normal, la vision est conservée.

Rats et souris. — Au bout de quelques jours on voit des néo-vaisseaux entourer le fragment, puis après 2 semaines, ils disparaissent. Les fragments arrivent à persister plus de 2 mois. Sur les coupes histologiques on ne retrouve que des fragments nécrosés entourés de tissu fibreux.

b) Inoculation de cellules trypsinées

Dans certains cas dans les jours qui ont suivi l'opération nous avons observé une hémorragie dans la chambre antérieure de l'œil. Cette hémorragie a disparu en 2 à 3 semaines. Dans le cas général on a vu dans les jours suivants un nuage correspondant aux cellules que l'on a inoculées. Ce nuage disparaît en 15 à 20 jours. Il reste une opacité du cristallin dans la moitié des cas. Chez les souris surtout il faut noter un aspect particulier : on voit la formation d'un dépôt blanc dans la partie déclive de la chambre ou l'apparition de flocons blancs. Sur les coupes histologiques il s'agit de dépôts fibrineux.

3° **Greffes sous-cutanées**

Aucun des souriceaux inoculés avec des cellules trypsinées n'a développé de tumeurs. Ils ont été gardés plus de 6 mois en observation.

4° **Greffes témoins de tumeur de Ehrlich**

a) Greffes intra-oculaires

En l'espace de quelques jours l'œil augmentait de volume et faisait saillie hors de l'orbite. Sur les coupes histologiques on constatait qu'il était envahi par un tissu tumoral analogue à celui que l'on rencontre quand on greffe ces cellules sous la peau de la souris pour obtenir des tumeurs solides.

b) Greffes intra-cérébrales

Les animaux sont morts en 8 à 10 jours en état de prostration. Sur les coupes histologiques nous avons observé la formation de petits nodules tumoraux à l'intérieur de la masse d'un hémisphère ou dans les ventricules.

5° **Inoculations dans la poche jugale du hamster**

Seul le hamster nous a donné des résultats nettement positifs (Figure 7). Le tableau suivant les résume :

		Nombre de hamsters inoculés		Nombre de tumeurs	
Greffe de cellules trypsinées	E 563	8	18	5	9
	E 602	10		4	
Greffe de fragments de tumeur	E 565	10	15	8	11
	E 603	5		3	

Au total sur 33 animaux survivants au 8e jour de l'inoculation 20 ont développé des tumeurs. Les résultats semblent meilleurs quand on inocule des fragments de tumeurs dans la poche (11/15) plutôt que des cellules trypsinées (9/18). En fait la différence entre les deux chiffres n'est pas significative.

Dans l'ensemble la croissance des tumeurs a été progressive ; vers le 15e jour on pouvait voir de petits nodules de 4 à 5 mm, ils atteignaient 2 cm de diamètre le 3e mois. Dans 2 cas (cellules trypsinées) les nodules tumoraux ne se sont manifesté que vers le 40e jour, petites masses de 1 à 2 mm, qui ont atteint 1 cm le mois suivant.

Les circonstances étaient telles en 1963 que faute de chauffage en hiver nous n'avons pas pu assurer la reproduction de nos animaux, et d'autre part il était impossible de faire venir des animaux de France, ce qui fait que nous n'avons pu transmettre ces tumeurs en série. Nous n'avons pu faire qu'un seul essai de transmission du Hamster au Hamster (E 581). Une tumeur obtenue par greffe d'un fragment et atteignant 2,5 cm de diamètre a été broyée à la presse de Fischer et inoculée dans la poche de 5 hamsters. Deux ont développé des tumeurs.

Au point de vue anatomo-pathologique la structure des tumeurs obtenues chez le Hamster est absolument identique à celle des tumeurs d'origine chez le Chien (Figure 12).

c) DISCUSSION

Il est incontestable que les résultats que nous avons obtenus ont été décevants sauf en ce qui concerne la poche jugale du Hamster.

La greffe intra-oculaire des tumeurs, facile à exécuter, a été particulièrement exploitée par GREENE qui pendant 15 ans a obtenu des résultats remarquables tant en ce qui concerne les tumeurs humaines que les tumeurs animales ; cependant GREENE a vu quelques échecs au cours de son expérimentation.

TOWBIN en 1951, sur 100 tumeurs humaines greffées dans la chambre antérieure de l'œil du lapin n'a eu que 2 résultats positifs nettement.

La même année ANDRUS, MEISSNER et WHORTON sur 49 tumeurs différentes de l'homme greffées dans l'œil du cobaye n'ont eu que 6 résultats positifs.

L'hétéro-greffe dans le cerveau a été obtenue par GREENE en 1951 à l'aide de tumeurs de souris, du sarcome de Rous, du carcinome de Brown-Pearce et de tumeurs humaines avec un très fort pourcentage de prises. Il introduisit directement dans le cerveau un minuscule fragment de tumeur à l'aide d'un trocart. Nous avons inoculé des cellules trypsinées et non des fragments. Nous ne pensons pas que notre technique soit à mettre en cause : ou nos animaux sont morts du choc opératoire ou ils ont survécu sans infection. L'inoculation des cellules trypsinées a été rarement entreprise. Signalons toutefois que DOZZA et TORLONE en 1960 ont greffé le sarcome de Sticker dans l'œil du chien à l'aide de cellules tumorales trypsinées. Il n'y a pas à proprement parler de différences entre une suspension de cellules trypsinées et une suspension de cellules de tumeur-ascite telle que la souche Ehrlich ou Krebs II après lavage. Or la tumeur-ascite d'Ehrlich prend à tous coups dans l'œil et le cerveau du rat et du cobaye.

GREENE en 1952 a tiré de l'étude de 123 tumeurs malignes différentes greffées dans l'œil du cobaye la conclusion suivante : « le tissu cancéreux capable de pousser dans l'œil du cobaye se trouve toujours à une étape d'évolution maligne caractéristique. Il s'agit toujours de tumeurs malignes ayant franchi la barrière lymphatique locale. D'où cliniquement la capacité qu'a un tissu tumoral de pousser dans l'œil du cobaye est un signe presque certain d'issue fatale pour le patient ayant fourni le tissu ».

D'autre part ALBRINK et WALLACE en 1953 ont comparé le développement en cultures tissulaires et en greffes dans l'œil et le cerveau d'espèces hétérologues de 33 tumeurs humaines malignes. Dans 13 cas où la culture s'était bien développée, la greffe hétérologue a échoué. A l'inverse 3 tumeurs ont donné des greffes positives et des cultures négatives. Dans 7 cas cultures et greffes hétérologues ont échoué, par contre elles ont été positives les unes et les autres pour les cas restant. On ne peut pas dire qu'il y ait un rapport entre la croissance en culture de tissu et en hétéro-greffe. Comme on le verra plus loin, le sarcome de Sticker se développe bien en cultures cellulaires. Le fait qu'il ne se soit pas développé dans l'œil et le cerveau ne permet pas de tirer de conclusions sur sa malignité. Peut-être que si nous avions utilisé les métastases de la tumeur aurions-nous eu des résultats différents. Il est incontestable que les tumeurs de greffe que nous avons employées, étaient localisées bien qu'atteignant une taille respectible. En tous cas nos résultats n'infirment pas la théorie de GREENE, théorie critiquée par de nombreux auteurs.

En ce qui concerne la greffe dans la bajoue du Hamster, les résultats sont différents, ils sont nettement positifs.

L'utilisation de la bajoue du Hamster par LUTZ et Col. en 1951 s'est révélée fertile en résultats développés particulièrement par H. TOOLAN et son école. Nous nous sommes placé dans des conditions expérimentales analogues à celles de H. TOOLAN quand elle a transmis de nombreuses tumeurs humaines chez le rat et le hamster (1953, 1954). Il s'agissait là d'animaux conditionnés par la cortisone et le sarcome de Sticker entre dans le cadre général des multiples cancers transmis chez les Rongeurs en état de réceptivité.

En dehors de toutes questions théoriques nous voyons surtout dans ces résultats un intérêt pratique. On peut ainsi avoir à sa disposition au laboratoire du matériel tumoral canin passé sur de petits animaux vivants dans un faible espace.

Le problème de l'expérimentation cancérologique chez le Chien est compliqué par le volume réservé au logement de cet animal et aussi par la difficulté de trouver des chiens d'expérience dans les pays trop civilisés où la sensiblerie des ligues protectrices des animaux est poussée à un point extrême. La transmission du sarcome de Sticker au Hamster permet dans une certaine mesure de parer à ces difficultés.

CHAPITRE II

LA CULTURE « INVITRO » DU SARCOME DE STICKER

A. — LA CULTURE « INVITRO » PROPREMENT DITE

I. — TRAVAUX ANTERIEURS

Les premiers auteurs qui ont réalisé la culture « in vitro » du sarcome de Sticker ont été les Japonais MATSUBA et HIROYE en 1927. Ils firent « plusieurs cultures qui montraient l'existence d'une prolifération à la fin des 36 premières heures qui devenait plus marquée après 48 heures. Ces cultures croissaient à la manière d'un carcinome de rat, mais les cellules étaient toutes du type usuel du tissu conjonctif. La migration périphérique de cellules rondes était suivie par la prolifération de fibroblastes typiques apparaissant seulement sur les marges de la culture et ne se mouvant jamais librement dans le plasma ».

En 1950 BLOOM, PAFF et NOBACK firent une très bonne étude de la croissance de la tumeur « in vitro ». Après 24 heures on distingue une zone moins dense à la périphérie des explants causée par une séparation générale des cellules tumorales, cellules rondes qui ont migré en grand nombre dans le milieu environnant. Quelques cellules fusiformes apparaissent çà et là. A 48 heures l'aspect général était celui d'une migration de cellules rondes accompagnées par la croissance et la migration de cellules fusiformes. En continuant la culture et en la transplantant apparaissait un changement de population. On finissait par ne plus trouver de cellules rondes et en 2 à 3 semaines la préparation finissait par ressembler à une culture pure de fibroblastes.

La description faite par les auteurs des cellules rondes offre tous les caractères du monocyte. Les cellules fusiformes sont considérées par les auteurs comme des fibroblastes. Pour BLOOM, PAFF et NOBACK la transformation d'une population cellulaire mixte faite d'une majorité de cellules rondes et de quelques cellules fusiformes en une culture pure de cellules fusiformes résulte du fait que les cellules rondes dégénèrent et meurent plus rapidement qu'elles ne se divisent. Cette transformation apparaît en 7 à 10 jours.

En 1956 AJELLO a fait une étude du développement du sarcome de Sticker dans des cultures en roller-tube. Il a observé qu'une capsule de

fibroblastes se forme à la périphérie de l'explant et ces éléments se différencient secondairement en cellules de type parenchymateux caractéristiques de la tumeur en passant par différentes phases intermédiaires. Ces observations renforcent l'opinion de l'auteur d'une dérivation stromale du tissu parenchymateux du sarcome de Sticker.

En 1960 LAGNEAU et CARTAUD ont cultivé des explants de tumeur sur plasma de poule. L'inoculation des cellules au chien a été négative.

Récemment PRIER en 1963 a étudié les besoins nutritifs « in vitro » des cellules du sarcome de Sticker. Il a montré que, quoique les cellules tumorales demandent une petite quantité de cystéine, les quantités présentes dans la plupart des milieux ordinaires sont léthales pour les cultures primaires. L'effet léthal n'est pas noté une fois que la croissance est établie. Il a utilisé surtout le milieu de Parker 199.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

L'origine de notre travail repose sur la culture « in vitro » d'une tumeur de Sticker enlevée chez une chienne Sloughi en novembre 1957. Nous avions été étonné par la richesse de la culture et par ce que nous avions pris à l'époque pour des corps d'inclusion, ce qui nous avait orienté dans la recherche d'une origine virale de la tumeur.

a) MATERIEL ET METHODE

I. — Matériel tumoral

Nous avons utilisé soit des tumeurs naturelles chaque fois que nous en avons eu à notre disposition, soit de préférence des tumeurs greffées chez le Chien ou le Chacal.

II. — Milieux de culture

1. — Plasma de poulet

Nous avons utilisé soit le plasma lyophilisé Difco qui ne nous a pas donné de bons résultats, soit du plasma préparé par nous-même par ponction cardiaque de coq New-Hampshire.

2. — Extrait embryonnaire de poulet

Dans toutes nos expériences nous avons utilisé l'extrait embryonnaire lyophilisé Difco au 1/3 ou au 1/5 dans du liquide de Hanks.

3. — Solutions salines

Pour le lavage des cellules avant ou après leur mise en culture nous avons employé soit la solution de Hanks (Institut Pasteur), soit la solution dite PBS (phosphate buffered saline) mise au point par DULBECCO et VOGT.

4. — Trypsine

Nous nous sommes servi de trypsine Difco à la concentration de 0,25 % dans les solutions de Hanks ou PBS stérilisée par filtration sur filtre Seits

EKS II, les concentrations de 0,15 ou de 0,20 % agissant trop lentement pour décoller les cellules adhérentes au verre.

5. — *Sérums*

Nous nous sommes servi pendant 4 ans de sérum de poulain préparé par l'Institut Pasteur d'Algérie, puis étant donnés les événements d'Algérie nous avons eu de grandes difficultés pour obtenir du sérum non hémolysé à l'Abattoir d'Alger et à ce moment nous avons fait appel au sérum de poulain de l'Institut Pasteur de Paris.

Au début de nos travaux nous avons peu utilisé le sérum de chien ; par la suite nous avons eu 4 chiens en bon état de santé réservés à cet usage. Le sérum prélevé sur chien à jeun était filtré sur Seitz et renouvelé tous les mois.

6. — *Milieux synthétiques et semi-synthétiques*

Nous avons utilisé les milieux semi-synthétiques à l'hydrolysat de caséine (LEPINE et col.), à la lactalbumine et le 199 de PARKER modifié en provenance de l'Institut Pasteur.

7. — *Antibiotiques*

Une solution mixte de Pénicilline G et de Streptomycine a été employée de façon à donner dans le milieu de culture une concentration finale de 200 UO et de 50 µg par ml.

8. — *Conservation des milieux*

L'extrait embryonnaire, la solution de trypsine et la solution d'antibiotiques ont été conservés au congélateur à — 27° C, les autres milieux à la glacière.

III. — **Verrerie**

Nous avons utilisé :
— des flacons dits de pharmacie de 125 et 250 ml en verre neutre,
— des flacons de Roux de 600 ml en Pyrex,
— des tubes à lamelles en Pyrex.

IV. — **Méthodes**

Nous avons employé différentes méthodes classiques sans chercher d'innovations.

a) — Méthode des explants en goutte pendante

Dans un cas nous avons utilisé la vieille méthode de CARREL.

b) — Méthode des explants en tube à lamelle

De petits fragments de 1/2 à 1 mm de côté ont été cultivés sur plasma de poulet en tubes à lamelle (2 à 4 par lamelle). Le milieu était formé soit

sérum de Cheval ou de Chien.

c) — Méthode de Maitland

Etant donnée la structure histologique de la tumeur nous avons pensé que l'action de la trypsine n'était peut-être pas utile pour obtenir une couche cellulaire. Le simple passage à la presse de Fischer de 4 à 5 ml de tumeur suffit à dissocier suffisamment le tissu pour arriver sensiblement au même résultat qu'avec la trypsine : cellules libres et petits agrégats de cellules. Les cellules après agitation à la pipette et lavage étaient mises en suspension dans un milieu formé de liquide de Hanks avec sérum de cheval avec ou sans extrait embryonnaire, milieu à la caséine avec ou sans extrait embryonnaire et sérum de cheval ou de chien.

d) — Méthode de trypsination

Nous avons employé 5 à 6 ml de tissu tumoral pour chaque essai. Après les trypsinations primaire et secondaire, trois lavages des cellules dans le liquide de Hanks et numération, les cellules étaient mises en suspension dans le milieu de culture à des doses variant de 200 000 à 1 000 000 par ml.

Milieux employés :

— Liquide de Hanks + sérum de cheval.

— Milieu à la caséine + sérum de cheval,
ou sérum de chien, ou ascite de chien.
ou liquide amniotique de bovin.

— Milieu de Parker 199 + sérum de cheval ou de chien,
ou les deux.

Dans tous les cas nous avons utilisé une solution d'antibiotiques telle qu'après addition au milieu, elle donnait une concentration de 200 UO de Pénicilline et de 50 µg de Streptomycine par ml de milieu.

Les cellules ont été étudiées au contraste de phase ou après coloration.

Fixateurs employés : Bouin ordinaire, trichloracétique ou alcoolique, Zenker, Formol salé, Suza, Serra, Alcool méthylique, Alcool acétique de Carnoy, Benoit, Palade.

Méthodes de coloration : Hémalun-éosine, Hématoxyline ferrique de Weigert ou de Heidenhain, Dominici, Mann, Wilder, P.A.S., Vert de méthylepyronine, Feulgen, Fuchsine de Altmann, Giemsa, Soudan III, Rouge gras, Lépine et Sautter, Bleu de Unna.

b) RESULTATS

Au point de vue chronologique la première culture « in vitro » que nous avons faite avec ce type de tumeur l'a été à l'aide de la technique classique des explants en tubes à lamelle avec un milieu simple à base de liquide de Hanks et de sérum de cheval. Cette culture a été repiquée 8 fois en tubes à lamelle et chaque fois avec le même pouvoir prolifératif. Cette

méthode ennuyeuse a été abandonnée pour la méthode de trypsination capable de fournir un matériel cellulaire infiniment plus important. Après un échec (E 259) nous avons réussi une culture en flacons (E 264) que nous avons trypsinée 8 fois de suite et que nous avons perdue à la suite d'un sabotage. Nous avons essayé de reproduire l'expérience et pendant plus d'un an nous avons échoué. Entre temps nous faisions des cultures de contrôle par la méthode des explants qui toujours ont été positives.

Nous avons essayé à un moment donné d'ajouter le sérum du chien donneur de la tumeur. La croissance a été 4 ou 5 fois plus grande qu'avec le sérum de cheval. Nous avons essayé les milieux à la caséine, à la lactalbumine avec de nombreux échecs, puis le 199 de Parker avec du sérum de cheval qui nous a permis de faire 8 passages dans une expérience E 480 et 5 dans une autre E 498. A ce moment nous avons utilisé conjointement le milieu 199 + sérum de chien + sérum de cheval qui nous a permis d'établir une souche en lignée continue 503. Par la suite nous avons fait plusieurs expériences de trypsination avec le même succès en utilisant le même milieu. Dans le but d'inoculer des cellules au chien nous avons créé 2 nouvelles souches 578 et 602 et nous avons fait des cultures en première explantation pour étudier les chromosomes des cellules en culture E 617 et 620.

1. — Les **tableaux** suivants résument les résultats.

Méthode des explants

Milieu	N° de l'expér.	Résultat	Observation
Hanks 6, sérum de cheval 4, extrait embryon. 1	190	+ + +	8 repiquages
— 10 — 8 — 2	206	+	
— 10 — 6 — 1	283	+	
— 10 — 8 — 0,5	306	+	
— 10 — 8 — 0,5	308	+	
— 10 — 10 — 1	434	+	
— 21 — 12 — 0,3	442 A	+ +	
M 199 9 — 1	459	+ +	
— 8 — 2	506 B	+ +	
— 8 — 2	542	+ + +	

Méthode de MAITLAND

Milieu	N° de l'expér.	Résultat	Observation
Hanks 20, sérum de cheval 10, extrait embryon.	339 A	0	
— 22 — 22	447 et 449	0	
— 20 — 12 — 0,5	367 A	+	
Caséine 40 — 10	339 B	0	
— 22 — 10	386 B	0	
— 70 — 10 — 1,5	361	0	
— 30 — 12 — 0,5	367 B	+	1 repiquage
— 30 — 12 — 0,5	370	0	
— 32, sérum du chien donneur 10	386	+ +	3 repiquages
— 25 — 5	401	0	

Méthode par trypsination

Milieu	N° de l'expér.	Résultat	Observation
Hanks 20, sérum de cheval 10	333 A	0	
— 23 — 26	451	+ +	
— 50 — 20, extrait embryon. 0,5	264	+ + +	10 passages
— 15, ascite chien 5	407 B	+	
Caséine, sérum de cheval 5 %	259	0	

Milieu	N° de l'expér.	Résultat	Observation
Caséine, sérum de cheval 10 %	321 328 333 B et 434 B	0	
— — 20 %	348	0	
— — 37 %	412	+ + +	
— — 37 %	419	0	
— — 30 %	459 A	+	
— — 40 %	472 B	+ +	
Lactal-Bumine — 10 %	442 B	0	
Caséine, ascite 40 %	404	+	
— sérum du donneur 20 %	407 A	+	
Caséine, liquide amniotique 30 %	472 A	0	
M 199, sérum de cheval 30 %	459 B	+ + +	6 passages
— — 45 %	480	+ + +	10 passages
— — 35 %	498	+ + +	6 passages
— — 15 % sérum de chien 10 %	503	+ + +	180 passages
— — 20 % — 10 %	506	+ + +	5 passages
— — 20 % — 10 %	579	+ + +	14 passages
— — 15 % — 10 %	602	+ + +	4 passages
— — 10 % — 10 %	617	+ + +	1er explant.
— — 10 % — 10 %	620	+ + +	1er explant.

De ces tableaux se dégagent plusieurs faits.

En ce qui concerne la méthode des explants nous avons eu toujours des résultats, plus ou moins bons, mais qui ont tenu à la mauvaise qualité du plasma Difco. Cependant la croissance est meilleure quand on emploie le milieu 199.

Nous n'avons évidemment pas fait de tableau pour une seule expérience

faite avec la méthode de CARREL en goutte pendante. Elle a été positive. Les fragments ont été entourés d'une couronne de cellules, mais cependant la croissance a été stoppée le troisième jour. Elle n'atteignait pas celle obtenue avec la méthode précédente.

En ce qui concerne la méthode de MAITLAND les résultats ont été franchement mauvais. Trois essais seulement ont été positifs et encore sans donner un beau tapis cellulaire.

Quant à la méthode de trypsination classique, nous avons eu des résultats partiels avec le liquide de Hanks additionné de milieux naturels divers : sérum de cheval ou ascite de chien inoculé dans le péritoine avec le sarcome de Sticker. Pour des raisons de commodité et de prix nous avons cherché à utiliser le milieu à la caséine qui donne des très bons résultats pour l'entretien des souches telles que KB et HeLa. Nour avons eu des résultats partiels. Seul le milieu 199 est un milieu convenable pour ce type de cellules. L'association 199, sérum de cheval, sérum de chien permet d'obtenir un tapis cellulaire rapidement et permet les repiquages. Le fait que nous ayons entretenu une souche en lignée continue sur plus de 180 passages pendant plus de 3 ans et demi plaide éloquemment en faveur de ce type de milieu.

2. — **Développement des cultures**

a) **Méthode des explants**

Dans les premières heures on voit des cellules se détacher du fragment et pointer dans une direction radiaire. En 24 heures on a une couronne de cellules en étoile. Dans les jours qui suivent on a une croissance luxuriante de cellules tassées les unes contre les autres avec un dispositif radiaire, donnant une image un peu analogue à du cœur embryonnaire de poulet. Ces cellules ont l'allure de fibroblastes (fig. 14). Elles sont allongées en fuseau avec un noyau ovale. A quelque distance du fragment les cellules s'étalent et à la périphérie prennent une forme triangulaire ou quadrangulaire. Peu gardent leur forme en fuseau.

b) **Trypsination**

24 heures après la mise en culture l'examen direct et celui des lames colorées montrent une majorité de cellules rondes adhérentes au verre, non étalées en grande majorité. Dans les jours qui suivent les cellules s'étalent sur le verre, puis des mitoses se voient et un tapis se forme. Les cellules ont une forme triangulaire ou rectangulaire avec un noyau central souvent proche d'un des côtés. Peu de cellules ont une forme en fuseau (fig. 15).

c) **Méthode de MAITLAND**

Dans cette méthode, de même que quand on trypsine la tumeur et quand on filtre sur gaze de nylon, on voit des amas, des groupes de 10, 20, 30 cellules qui adhèrent au verre. Ces groupes, peu épais, montrent après coloration la structure du tissu tumoral : des cellules tassées les unes contre les autres avec parfois quelques fibres conjonctives reconnaissables. De la périphérie de ces amas se détachent des cellules qui migrent, s'étalent et prennent la forme que nous venons de décrire au paragraphe B. Les cellules isolées se conduisent comme dans la trypsination.

d) **Trypsination des explants**

Nous avons fait l'expérience suivante (E 459) : en même temps que nous trypsinions une tumeur, nous avons découpé quelques centaines de fragments de 1/2 mm que nous avons déposés dans un flacon de 125 ml dont le fond était recouvert d'une mince couche de plasma. Après coagulation avec de l'extrait embryonnaire on a recouvert les explants d'un milieu identique à celui utilisé pour les cellules trypsinées : 199 + sérum de cheval. En quatre jours les explants avaient poussé et chacun était entouré d'une auréole de cellules d'allure fibroblastique. En secouant fortement le flacon les fragments initiaux se sont décollés. On a rejetté alors le milieu et ajouté de la trypsine (10 ml). En quelques minutes le plasma a été digéré et les plages cellulaires se sont décollées. Il ne restait seulement que quelques fragments après agitation. On agite à la pipette pour séparer les cellules, on centrifuge pour écarter la trypsine. On remet en suspension dans le milieu adéquat et on inocule des tubes à lamelle. En 48 heures on obtient un tapis. Les cellules ont pris à ce moment un aspect identique à celui des cellules trypsinées une semaine avant.

Expérience inverse. — Dans certaines de nos variantes de la souche 503 se produit vers le 10e jour après la trypsination une déchirure du tapis et la formation de rouleaux. Nous avons détaché de ces rouleaux à la pipette, découpé en fragments de 1 à 2 mm aux ciseaux, puis nous les avons mis en culture en tubes à lamelle sur plasma de poulet. La masse cellulaire se comporte comme un fragment tissulaire et en particulier il n'y a pas de migration de cellules éparses dans le plasma au moment où on les y dépose. Dès le lendemain des cellules commencent à migrer de la périphérie suivant un dispositif radiaire avec l'aspect fibroblastique typique (fig. 20).

Ces cellules sont douées de polymorphisme. Quand on les cultive sur plasma de poulet, elles sont tellement tassées les unes contre les autres que mécaniquement elles prennent une forme allongée en fuseau. Si l'on supprime ces forces de compression elles s'étalent au maximum sur le verre et prennent une forme quadrangulaire.

Il s'agit bien des cellules de la tumeur elle-même qui se développent et non des cellules d'un stroma presque inexistant. On s'en rend parfaitement compte dans les cultures type MAITLAND ou DULBECCO. Les petits groupes de 10 à 30 cellules sont parfaitement bien identifiés par coloration, et en particulier ceux qui ne contiennent pas de stroma conjonctif. A la périphérie on voit les cellules s'aplatir, s'étaler sur le verre puis entrer en mitose.

3. — La souche 503

Nous nous étendrons plus en détail sur une souche de culture cellulaire que nous entretenons depuis plus de 3 ans.

Le 21.7.1961 nous avons fait l'exérèse d'une tumeur greffée chez le chien 110 mâle le 29.12.1960 (souche A, 9e passage). Cette tumeur s'était bien développée et avait le volume du poing quand nous l'avons prélevée. Elle n'était pas ulcérée, ni nécrosée. Nous avons pris 5 ml environ qui ont été trypsinés suivant la méthode indiquée plus haut. Après la dernière centrifugation nous avons ensemencé à raison de 500.000 cellules par ml des tubes à lamelles, des flacons de Roux et des flacons à pharmacie avec le milieu suivant :

Milieu 199 modifié 100

Sérum de cheval	20
Sérum de chien	15
Pénicilline	100.U0/ml
Streptomycine	50 µg/ml

La phase gazeuse a consisté en l'air atmosphérique. L'incubation a été faite à 37° C.

Développement de la culture

Le 3e jour un grand nombre de cellules ayant adhéré au verre et commençant à s'étaler, nous avons changé le milieu pour éliminer les cellules non fixées. Le 8e jour nous avons à nouveau changé le milieu. Un tapis cellulaire s'étant formé progressivement et ayant couvert toute la surface du verre, le 15e jour nous avons procédé à un premier repiquage suivant la méthode de DULBECCO et VOGT (1954), perfectionnée par YOUNGER (1954).

A chaque flacon vidé de son milieu nous avons ajouté 10 ml de solution de trypsine à 0,25 %. Après quelques minutes à la température du laboratoire et agitation à la main les cellules se détachent par lambeaux. Elles sont brassées à la pipette, recueillies dans un pot à centrifuger et soumises à une centrifugation lente (600 tours/minute) pendant 3 minutes.

Après élimination du surnageant le culot cellulaire est remis directement en suspension dans le milieu nutrifif sans lavage préalable.

Entretien

Après la trypsination les cellules sont fixées avant 24 heures par petits groupes séparés ou isolément. Elles s'étalent progressivement et finissent par former un voile sur toute la surface du verre en 2-4-6 jours suivant la quantité inoculée.

Pendant les premiers passages nous avons ensemencé massivement. Les repiquages par la suite ont été faits en principe toutes les semaines par dichotomie.

Nous avons progressivement diminué les proportions de sérum homologue et après le 100e, nous l'avons supprimé en augmentant la quantité de sérum de poulain, et ce, sans modifier le taux de croissance.

Après le 2e passage nous avons divisé la souche en 2 lignées α et β, elles-mêmes par la suite divisées en sous-lignées que nous avons entretenues séparément comme s'il s'agissait de souches différentes.

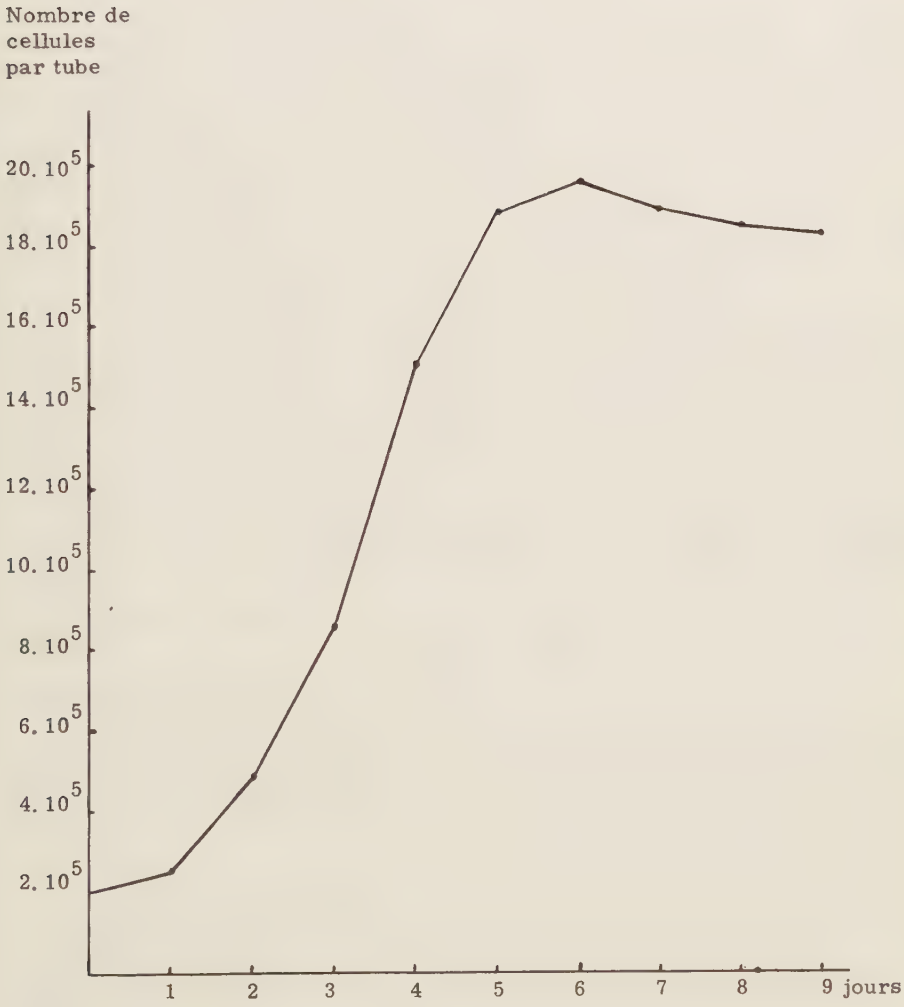
Taux de croissance

En adoptant le rythme du dédoublement des flacons lors des repiquages et en surveillant chaque jour la croissance des cellules, on pouvait voir, surtout après le 50e passage, que le 4e jour le flacon était entièrement recouvert d'un tapis cellulaire. Nous attendions 2 ou 3 jours pour repiquer.

Nous avons mesuré la vitesse de croissance suivant la méthode de FERNANDES (1958).

Nous avons ensemencé des tubes à lamelles (2 ml) avec une suspension comptant 100.000 cellules par ml. Pendant 8 jours à 24 heures d'intervalle nous avons compté les cellules des tubes. Pour cela les cellules ont été

Courbe de croissance de la souche 503
(Lignée β 2B, 120e passage)



trypsinées et leur nombre mesuré avec l'hématimètre de Malassez. La valeur pour chaque jour était la moyenne de 4 tubes.

On constate un maximum vers le 5°-6° jour avec une chute lente ensuite.

Conservation

En changeant le milieu une fois par semaine on peut conserver les cellules pendant plus d'un mois à l'étuve.

Si l'on ne change pas le milieu elles peuvent se conserver et être repiquées pendant 15 à 20 jours à 37° C suivant les lignées, 3 semaines à 25° C, le tapis cellulaire restant à peu près intact. Nous avons essayé de les garder à + 4° C à la glacière suivant la méthode de SWINE et PARKER, le résultat est infiniment moins bon. Pareille constatation a été faite par MAURIN et SANG avec leur souche EPL et par DANIEL et BROZ avec des cellules de rein de singe en première explantation et les cellules KB.

En Algérie nous avons fait des essais de congélation à court terme. Les cellules trypsinées mises en suspension dans le milieu additionné de 15 % de glycérol et congelées lentement en abaissant la température de + 25° C à — 50° C en 25 minutes se conservent bien pendant 3 jours à — 80° C.

Par la suite nous avons utilisé la méthode mise au point au Wistar Institute. On trypsine un flacon. Les cellules sont mises en suspension dans le milieu additionné de 10 % de glycérol. On ajuste à 4-5 millions de cellules par ml. On répartit en ampoules que l'on scelle. Ces ampoules sont gardées quelques heures à la glacière. On agite afin de remettre en suspension les cellules déposées dans le fond de l'ampoule. On porte au congélateur à glace carbonique dans des boîtes de liège artificiel, la congélation se fait lentement.

Pour remettre en culture on réchauffe les ampoules dans de l'eau à 37° C, leur contenu est mis dans un petit flacon, on complète avec du milieu neuf enrichi en sérum. Le lendemain on change le milieu. Le tapis se reforme lentement.

Des cellules congelées ainsi pendant 6 mois ont pu fournir 20 passages successifs.

Morphologie des cellules en culture

Un certain nombre de cellules ont gardé une forme de fuseau aplati. Dans l'ensemble elles ont une forme triangulaire ou quadrangulaire avec des extrémités effilochées en fins prolongements qui relient les cellules les unes aux autres (fig. 17 et 18).

a) **Le noyau**

Le noyau est le plus souvent ovale, quelquefois indenté ou lobulé avec une membrane nucléaire distincte.

Il mesure en moyenne 16 μ dans son grand axe, 8 dans le petit. Une courbe établie sur 160 mesures de longueurs au 22° passage montre une répartition en cloche.

La chromatine est finement ponctuée avec peu de chromocentres au contraire des cellules de la tumeur étudiées sur les coupes.

Les nucléoles sont en nombre variable de 1 à 7. Ils ont un aspect muriforme avec des régions basophiles et de petites taches éosinophiles.

Trois types de cellules géantes apparaissent dans les cultures.

— Certaines ont un énorme noyau 4 à 5 fois plus grand que le noyau type.

— Un deuxième type est formé de cellules multinucléées dans lesquelles les noyaux ont une taille assez proche de ceux des cellules mononucléées. En général elles sont binucléées.

— Un troisième type d'allure très irrégulière avec plusieurs noyaux de taille très inégale (jusqu'à 15-20) réunis en couronne ou disposés au hasard avec l'aspect d'une cellule géante syncytiale. Certains noyaux ont une forme en anneau.

Il arrive souvent qu'à côté d'un noyau normal se voient un ou plusieurs « micronoyaux » ronds de 2 à 4 μ de diamètre.

Les mitoses sont en général normales, parfois cependant tri- ou quadripolaires. Il faut noter que souvent l'on voit des cellules binucléées en prophase avec les 2 noyaux au même stade.

b) **Le cytoplasma**

Le cytoplasme se divise en trois zones distinctes :

— Une zone en demi-cercle sur un des côtés du noyau, finement ponctuée, éosinophile. Dans les cellules bi- ou multinucléées cette zone jouxte les différents noyaux.

— Une zone dense autour avec un aspect particulier. Elle est riche en mitochondries et contient des grains osmiophiles, éosinophiles, entourés d'un halo clair formant une sorte de pavage. Cette zone contient parfois des enclaves de particules phagocytées.

— Une zone hyaloplasmique très étendue, très mince, peu colorable. Cette zone émet des prolongements dentelés, sortes de pseudopodes longs et effilés qui articulent les cellules les unes aux autres.

Dans les cellules repiquées depuis peu on trouve des vacuoles graisseuses à la limite de la zone des grains et du hyaloplasme souvent alignées en rangées dans celui-ci. Ces gouttelettes sont petites (1 à 2 μ) de taille semblable, osmiophiles, soudanophiles.

Nous nous sommes penché sur le cas des granules de la zone médiane. Ces grains sont Feulgen-négatifs, PAS-positifs, colorés en rouge par la méthode de BRACHET, et non colorés après action de la ribonucléase, argentophiles. Ils ne sont pas métachromatiques.

Au microscope électronique ils apparaissent comme des masses denses, homogènes, non perméables aux électrons.

Nous avons étudié le chondriome par la fuchsine de ALTMANN après fixation au Benoit, à l'hématoxyline ferrique de HEIDENHAIN après fixation au Palade ou au contraste de phase. Il est formé de mitochondries dans la zone moyenne, de chondriocontes à la périphérie bien visibles au microscope électronique sur les cellules cultivées sur formvar.

La description que nous venons de donner des cellules de la souche 503 est valable pour toutes les expériences de mise en culture que nous avons faites (fig. 16).

Athrocytose-Phagocytose

Ces cellules possèdent des propriétés remarquables d'athrocytose et de phagocytose.

1° **Action du rouge neutre**

On remplace le milieu d'un tube à lamelle par une solution de rouge neutre à 1/20.000 dans le Ringer. En quelques minutes apparaissent des vacuoles colorées. Si l'action se prolonge tout le cytoplasme est bourré de ces vacuoles à l'exception de la zone juxtanucléaire.

2° **Action du carmin lithiné**

De même si l'on ajoute au milieu une goutte de solution de carmin lithiné à 1/500 ou 1/1.000, on voit apparaître progressivement des enclaves rouges dans le cytoplasme. Des cellules en mitose peuvent en contenir. L'action est plus lente que celle du rouge neutre mais aussi tenace (fig. 19).

3° **Encre de Chine**

Si l'on met une gouttelette d'encre de Chine bactériologique dans le liquide de Hanks qui a remplacé le milieu, les cellules se chargent de particules noires.

4° **Action du Bleu Trypan**

Dans des tubes à lamelles, nous avons ajouté au milieu lors du 170e passage (3 ans et demi de culture) une goutte de solution à 1/500 de Bleu Trypan. En 2 à 3 heures les cellules commencent à se charger de colorant.

5° **Phagocytose**

Fréquemment, surtout dans les cultures vieillies, on voit des cellules contenir des vacuoles remplies de débris cellulaires phagocytés.

Nous avons vérifié le pouvoir d'athrocytose sur des cellules de première explantation soit trypsinées soit sur plasma de poulet. Les cellules se chargent rapidement de rouge neutre quelle que soit leur forme en fuseau ou aplatie. De même elles accumulent carmin lithiné et encre de Chine. Leur pouvoir de phagocytose est aussi marqué.

Cet ensemble de propriétés physiologiques n'est donc pas réservé aux cellules de souche mais appartient également aux cellules tumorales de première explantation.

c) **DISCUSSION**

Certains ont pu être surpris par l'allure fibroblastique des cellules qui se développent « in vitro » sur plasma de poulet. Nous estimons que les cellules qui se développent « in vitro » sont bien les cellules de la tumeur et non celles d'un stroma conjonctif presque inexistant. L'évolution des cellules dans les premiers jours nous le montre, à condition d'employer d'autres méthodes de culture. Le passage des formes en fuseau aux formes étalées

par la trypsination des explants en est la preuve. Ces cellules sont douées de pléomorphisme, variant selon le milieu qui les entoure et le substrat qui les porte.

Nous pensons que ces cultures « in vitro » peuvent apporter leur contribution à une meilleure connaissance de la nature de la tumeur de Sticker.

Nous avons cultivé la rate du chien par trypsination suivant une méthode personnelle dont nous indiquons plus loin la méthode, méthode qui nous permet d'éliminer la majeure partie des hématies. Les lymphocytes ne se multipliant pas, on retrouve sur les lamelles quelques fibroblastes, quelques macrophages bien reconnaissables à leur voile cytoplasmique et des cellules histiocytaires. Ces cellules histiocytaires qui ont pour origine les cellules réticulées de la rate offrent le même aspect morphologique et les mêmes propriétés physiologiques que les cellules du sarcome de Sticker.

Sur les empreintes de tumeurs colorées au Giemsa on compte en gros 60 % de cellules réticulées et 40 % de cellules à allure d'histiocytes. Il est difficile de dire comment évoluent ces cellules en culture même quand on les examine dans les premiers jours qui suivent la trypsination. Environ la moitié des cellules possèdent un noyau central, l'autre moitié un noyau collé à un des côtés, ce qui pourrait faire penser que les histiocytes sont restés individualisés. En fait les caractères tinctoriaux des noyaux et du cytoplasme, les propriétés physiologiques sont identiques dans les deux sortes de cellules.

Notre Maître J.-M. MONTPELLIER en se basant sur la seule anatomie pathologique a été le premier à attirer l'attention sur la nature de réticulosarcome de la tumeur de Sticker, il y a près de 30 ans.

En 1950 BLOOM, PAFF et NOBACK ont essayé de montrer que les cellules de cette tumeur pouvaient avoir une origine réticulo-endothéliale. Ils ont injecté à plusieurs reprises une solution de Bleu trypan à 1 % dans la veine d'un chien porteur d'une tumeur greffée et fait des biopsies à intervalles réguliers. Alors que les macrophages étaient massivement colorés, les cellules tumorales ni sur les coupes, ni sur les empreintes ne montraient de coloration. Les auteurs pensaient que ces cellules pouvaient avoir une origine réticulo-endothéliale mais qu'étant matures elles avaient apparemment perdu leur morphologie d'origine et leurs caractéristiques physiologiques.

D'autres tels que NANTA et col. ont apporté leur contribution à une meilleure connaissance des cellules de cette tumeur grâce aux méthodes cytologiques classiques. Nous-mêmes avons plus haut exposé notre conception : histologiquement cette tumeur est un réticulo-sarcome.

Nous estimons que nos études de culture « in vitro » apportent quelque chose de plus que la cytologie classique des frottis de tumeurs : ce sont les propriétés physiologiques des cellules. Ces cellules ont l'allure de réticulohistiocytes, elles en ont aussi les propriétés.

L'état histiocytaire est caractérisé par un ensemble de propriétés physiologiques : athrocytose, phagocytose, haut pouvoir de synthèse protéique, élaboration de globulines-anticorps. C'est l'ensemble de ces caractères qui confère l'état histiocytaire (J.A. THOMAS, 1949).

Le principal de ces caractères est un pouvoir de synthèse élevé permettant une prolifération durable par la seule utilisation des protéines sériques. Dans une expérience (E 451) des cellules trypsinées ont donné un beau tapis cellulaire avec comme milieu un mélange sensiblement à parties égales de liquide de Hanks et de sérum de cheval.

Les propriétés d'athrocytose ont été vérifiées de même que la phagocytose. Ces propriétés ont un caractère durable puisqu'on les observe au 170e passage de notre souche.

En dehors de la faculté d'élaborer des globulines-anticorps que nous n'avons pas étudiée, nous constatons que les cellules du sarcome de Sticker possèdent « in vitro » les propriétés qui caractérisent l'état histiocytaire.

« Cet état n'est pas limité aux « histiocytes » du tissu conjonctif, mais peut être adopté par des cellules dérivées non seulement du mésenchyme, mais aussi par certaines autres d'origine tissulaire et embryologique diverses » (J.A. THOMAS, 1949).

Dans le cas qui nous occupe s'agit-il de cellules qui ont acquis l'état histiocytaire en culture ? Nous ne le pensons pas puisque en première explantation toutes les cellules présentent ces caractères et d'autre part il y a tout de même l'aspect morphologique des cellules de la tumeur qui permet de les étiqueter. Il s'agit donc ici de la conservation et non de l'acquisition de l'état histiocytaire « in vitro ».

B. — INTERET PRATIQUE DE LA SOUCHE 503 POUR LA CULTURE DES PROTOZOAIRES PARASITES INTRA-CELLULAIRES

Il y a un demi-siècle différents chercheurs ont isolé des parasites à partir de la tumeur de Sticker et chacun a cru voir l'agent causal de cette maladie contagieuse vénérienne.

SAN-FELICE le premier isola en 1905 un **Blastomyces** qu'il considéra comme agent de la maladie.

METTAM note en 1907 la présence de nombreux **Spirochètes** sur des frottis d'une tumeur colorée au Giemsa. Il vit là une analogie avec la syphilis.

BORREL la même année examine une tumeur vénérienne siégeant dans le vagin d'une chienne. Dans la zone d'envahissement, dans les glandes sous-cutanées et dans les digitations épithéliales profondes, il constate des parasites en grand nombre, qu'il identifie à des larves **d'Acariens.** BORREL pense que ces larves sont des agents d'inoculation.

Aucune de ces hypothèses n'a été confirmée expérimentalement.

TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons nous-mêmes constaté que les tumeurs de Sticker pouvaient héberger divers parasites intra- ou extracellulaires.

A différentes reprises notre collègue J. POUL de l'Institut Pasteur d'Algérie et nous-mêmes avons isolé un organisme poussant en milieu cœur de bœuf et offrant les caractéristiques des colonies de PPLO, soit en milieu liquide, soit sur gélose. Nous n'avons pas fait d'inoculation des cultures de cet organisme au Chien, cette ligne de recherches ayant été interrompue à cause des évènements d'Algérie.

Il semble qu'en ce qui concerne au moins les dix premiers passages de notre souche A, celle-ci ait été contaminée, ce qui n'a d'ailleurs altéré en rien la vitalité des tumeurs et leur aptitude à croître.

D'autre part nous avons isolé d'une tumeur un parasite identifié à **Toxoplasma gondii.**

Il nous est arrivé en trypsinant des tumeurs greffées de déceler des microfilaires de **Dirofilaria immitis.** Ces microfilaires n'avaient pas été gênées par l'action de la trypsine et étaient fixées par une extrémité à un agglomérat de cellules fixées au verre. Elles ondulaient à la surface de la couche cellulaire. Nous les avons conservées vivantes pendant plus de trois semaines en changeant le milieu. Il ne semble pas qu'elles aient eu une action néfaste sur les cellules en culture.

Nous basant sur la seconde de ces observations, nous avons pensé qu'il serait intéressant de constater si la souche cellulaire 503 était susceptible de permettre la culture de certains parasites intracellulaires.

1. — **Toxoplasma gondii**

a) *Histoire de l'expérience*

Le 7.12.1962 nous avons fait l'exérèse d'une tumeur sous-cutanée greffée chez le chien 231. Ce chien avait été inoculé trois mois auparavant (16e passage de la souche A). Cette exérèse avait deux fins : 1° assurer le 17e passage de notre souche par greffe chez le chien, 2° nous permettre de faire une culture de cellules « in vitro », d'établir une nouvelle souche en lignée continue et de voir si les cultures lors des premiers passages pouvaient redonner une tumeur après récolte dans les flacons et inoculation au chien.

Nous avons trypsiné la tumeur selon la méthode habituelle et ensemencé des flacons de Roux et quelques tubes de Leighton dont une partie seulement a été colorée pour contrôle. Après le second passage nous avons entretenu la souche uniquement sur flacons de Roux sans faire de coloration de lamelles, le simple examen des flacons au microscope nous permettant de juger de la valeur du tapis cellulaire.

Les quatre premiers passages ont été faits à des intervalles de 5 à 6 jours. La croissance était régulière, le tapis cellulaire couvrant le fond du flacon le quatrième jour. Le cinquième passage a été fait le 8e jour, alors que le tapis était formé déjà depuis 4 jours. A partir de ce moment nous avons constaté un changement dans le comportement de la culture et ce dans toutes les sous-lignées que nous cultivions séparément. Dans l'ensemble, le fond du flacon était couvert par un tapis cellulaire, mais il y avait des zones où les cellules poussaient mal. Les passages suivants ont été faits à des dates plus éloignées 13, 8, puis 10 jours.

Le milieu devenait trouble quelques jours après la trypsination et les ensemencements ont été négatifs. Nous avons enfin pensé à cultiver en tubes à lamelle et là, après coloration, nous avons vu des parasites intra-cellulaires.

Nous avons continué les passages mais avec une croissance de moins en moins régulière. Deux des sous-lignées que nous avions établies ont été perdues aux 8e et au 10e passage, la lignée principale au 14e.

b) *Identification du parasite*

Nous avons d'abord pensé qu'il s'agissait d'une sarcosporidiose. Si l'on voyait certaines cellules contenir 1, 2 ou plusieurs parasites en forme de banane, larges de 2 μ, longs de 4 à 5 μ, d'autres contenaient des formations évoquant les kystes de la sarcosporidiose. Cependant **Sarcocystis** a une taille plus grande et chez l'animal les kystes sont situés entre les faisceaux musculaires et non intra-cellulaires. Nous nous sommes orientés alors vers l'idée de **Toxoplasma.**

Dans une première expérience le milieu d'un flacon de Roux a été centrifugé et le culot inoculé dans le péritoine et le cerveau de souris qui n'ont pas présenté de symptômes par la suite.

Nous avons repris l'expérience en faisant des passages à blanc et en inoculant les cellules d'un flacon de Roux trypsinées dans le péritoine de souris. Le 10e jour, 5 souris ont été sacrifiées, le cerveau et la rate broyés et après mise en suspension dans le liquide de Hanks, réinoculés à d'autres souris. Après avoir fait un troisième passage, 10 jours après, une souris a présenté un sérosité dans le péritoine avec des parasites. Le 4e passage a donné une ascite riche en parasites chez toutes les souris inoculées.

D'autre part nous avons utilisé une souche de **Toxoplasme** entretenue sur plus de 500 passages chez la souris par Mr. L. BALOZET à l'Institut Pasteur d'Algérie. A partir du liquide d'ascite de la souris nous avons obtenu après numération une suspension à 30.10^6 toxoplasmes par ml. Lors de repiquage de notre souche 503 nous avons ensemencé en même temps un flacon et des tubes à lamelle avec les cellules de souche et la suspension de toxoplasmes à raison de 100.000 toxoplasmes par ml de milieu (1 parasite pour 3 cellules). Nous avons recommencé l'expérience à raison de 3 parasites pour 1 cellule. Dans les deux cas nous avons reproduit les mêmes lésions cellulaires, plus importantes lorsque l'inoculum était plus riche.

Nous avons donc été amené à identifier le parasite isolé avec **Toxoplasma gondii** de par sa morphologie propre, son évolution chez la souris et l'identité des lésions produites dans des cultures cellulaires de même origine.

c) *Origine et devenir du parasite*

Nos milieux de culture étant filtrés et stériles, le parasite ne peut provenir que de la tumeur. Des tubes à lamelle de la première explantation et du 2e passage que nous avions oubliés à l'étuve ont été repris après deux mois et colorés. Il restait encore quelques cellules qui se sont révélées contenir le parasite. Donc, lors de l'explantation primaire, le parasite existait bien, mais en faible quantité, car nous ne l'avons pas retrouvé en reprenant l'examen des premières lames colorées.

Nous avons dit que la tumeur du chien 231 qui a donné la souche 579 parasitée a servi à faire le 17e passage de greffe. Un des chiens de ce dernier (C 223) a servi à son tour à faire le 18e passage le 4.2.1963. Dans cette série le chien 264 a été opéré le 22.3 et nous avons fait une culture « in vitro » avec sa tumeur. Nous avons gardé certains tubes 15 à 20 jours. Sur 4 repiquages successifs nous n'avons pas vu de cellules parasitées.

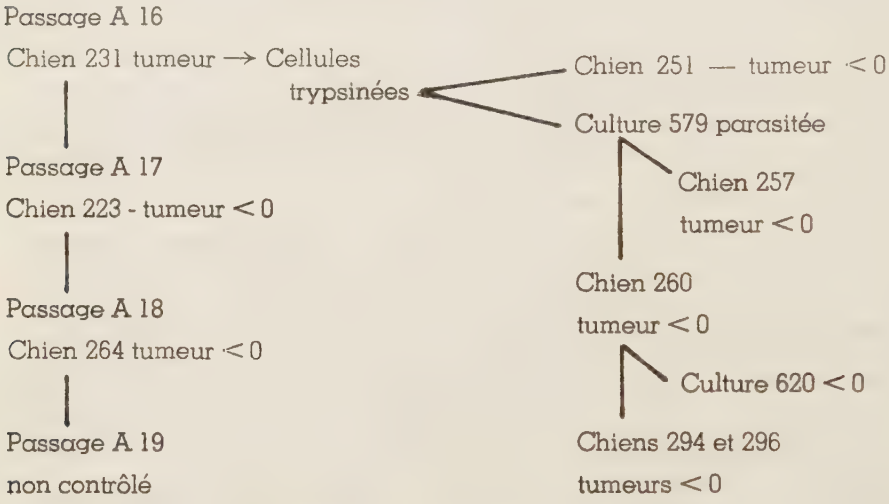
D'autre part un des chiens (260) inoculés avec la souche 579 parasitée a développé une tumeur que nous avons fait pousser en culture. Nous n'avons retrouvé le parasite ni sur la coupe de tumeur, ni sur les cellules en culture.

Nous n'avons pas retrouvé le parasite sur les coupes des tumeurs des chiens 231, 223 et 264.

En 4 ans nous avons fait de nombreuses cultures « in vitro » à partir de tumeurs de Sticker greffées, nous n'avons jamais rencontré de toxoplasme dans ces cultures, alors que toutes nos lamelles étaient colorées.

Il est fréquent en Algérie de trouver des chiens porteurs de Toxoplasmes. Il faut donc admettre qu'il s'agit là d'un cas fortuit.

Le tableau suivant résume ces observations :



d) *Culture de Toxoplasma gondii sur la souche 503*

Dans une première expérience (594) nous avons inoculé des cultures de la souche 503 en tubes à lamelle avec quelques gouttes du milieu de la souche 579 parasitée. Après coloration quelques cellules se sont révélées héberger le parasite.

Dans une deuxième expérience (595) nous avons trypsiné un flacon du 10e passage de la souche 579 qui ne contenait plus que quelques cellules adhérentes au verre et nous les avons mélangées avec les cellules trypsinées d'un flacon de la souche 503. Nous avons ensemencé flacons et tubes à lamelle. Les tubes à lamelle se sont montrés richement parasités. Dans les flacons nous avons obtenu un tapis cellulaire qui a été trypsiné deux fois de suite, mais en donnant une culture en mauvais état au second passage.

Lorsque nous nous sommes rendu compte que nous ne pourrions plus conserver la souche parasitée, nous avons cherché à conserver le parasite qui à l'époque n'avait pas encore été identifié.

Nous avons mis à profit l'identité cellulaire entre les souches 503 et 579. Comme plus haut nous avons recueilli par trypsination le peu de cellules qui restaient dans un flacon de 579 et celles d'un flacon de 503 à son 83e passage. Le 8e jour, le flacon inoculé qui présentait un tapis homogène (les tubes témoins montraient le parasite) a été repiqué. Le tapis qui

s'était de nouveau formé le 3e jour était presque complètement détruit le 8e jour. Nous avons recommencé l'expérience pool d'un flacon détruit et d'un flacon normal et le cycle en pool suivi d'un repiquage normal s'est poursuivi pendant 3 mois sur un total de 12 repiquages. Nous avons cessé ceux-ci à notre départ d'Algérie. La durée du cycle durait de 14 à 18 jours.

e) Lésions cellulaires provoquées par Toxoplasma gondii

Les lésions provoquées dans les cultures cellulaires par **T. gondii** sont fonctions du degré d'inoculation et la durée de l'infestation (fig. 21 et 22).

La lésion élémentaire est un parasite inclus dans une vacuole. Nous avons vu de nombreuses cellules en mitose contenir 1, voire 2 parasites. L'infestation modérée ne gêne pas la multiplication des cellules.

Il peut y avoir infestation multiple, on voit plusieurs parasites inclus chacun dans une vacuole, épars dans la lame cytoplasmique.

Les **T. gondii** vont se multiplier dans la cellule. Dans un premier stade, on voit une vacuole contenir 2 parasites accolés symétriquement. Quand on fixe les cellules avec le liquide de Palade, on voit entre les deux toxoplasmes une mince cloison cytoplasmique. Si alors on colore par la fuchsine d'Altmann on voit des mitochondries à chaque extrémité de cette fine cloison. Au contraste de phase, elle est très difficile à identifier, les deux parasites étant serrés l'un contre l'autre ; la fixation les sépare. Il peut y avoir un nombre variable de paires correspondant à un degré d'infestation multiple.

Quand un parasite entre dans la cellule, il se multiplie par 2, puis par 4 et forme une rosette d'une géométrie parfaite. Il peut y avoir plusieurs rosettes dans la cellule. A ce stade on ne distingue pas de cloison entre les parasites.

Les **T. gondii,** après avoir formé une rosette, continuent à se multiplier et sont inclus en très grand nombre dans une coque qui peut déprimer le noyau si elle se trouve dans son voisinage. Les coques peuvent être multiples. Elles finissent par éclater et le parasite peut ainsi se répandre dans la culture et contaminer d'autres cellules.

On peut enfin voir l'association de ces différents types dans des cellules géantes qui ont conservé un noyau apparemment intact avec une coque, des rosettes ou des **T. gondii** isolés dans le cytoplasme.

f) Remarques

Toxoplasma gondii, parasite intra-cellulaire obligatoire (SABIN et OLITSKY, 1937), est assez ubiquiste. On l'a trouvé dans de nombreuses espèces de Mammifères, d'Oiseaux et de Reptiles. On l'a isolé d'organes divers : rate, cerveau, foie, poumon (JACOBS, 1956). A notre connaissance c'est la première fois que l'on isole **T. gondii** d'une tumeur animale.

T. gondii a été cultivé pour la première fois par LEVADITI, SANCHIS-BAYARRI, LEPINE et SCHOEN en 1929 sur des tissus embryonnaires de poulet et de pigeon.

Page suivante, un tableau montre les principaux travaux.

Dans ces travaux, les auteurs ont inoculé des cultures cellulaires avec un parasite connu. En 1954 JACOBS, FAIR et BICKERTON ont utilisé des cultures de tissus de Souris pour isoler **T. gondii** d'un cas de chorio-rétinite humaine.

Dans notre cas, c'est la culture elle-même qui a révélé le parasite dont la virulence a été en augmentant.

Enfin, nous avons montré une méthode de conservation prolongée du parasite « in vitro » par trypsination alternée du système cellules inoculées, cellules inoculées et cellules fraîches.

Année	Auteurs	Méthode
1929	LEVADITI, SANCHIS-BAYARRI, LEPINE et SCHOEN	Tissus embryonnaires de poulet et de pigeon infectés
1937	SABIN et OLISTSKY	Tissus embryonnaires de poulet
1942	GUIMARAES et MEYER	— — —
1943	MEYER et DE OLIVEIRA	— — —
1952	MUHLPFORDT	— — —
1953	HOLZ et ALBRECHT	Moelle osseuse
1953	LOCK	Cœur embryonnaire de rat
1954	CHERNIN et WELLER	Tissus embryonnaires de souris et d'homme
1954	PULVERTAFT, VALENTINE et LANE	Tumeur ascite Krebs II et sarcome 37
1954	VISCHER et SUTER	Cultures de macrophages
1956	BALDUCCI et TYRRELL	Rein de lapin et HeLa
1956	EICHENWALD	Rein trypsiné et HeLa
1956	SCHUHOVA, BONNOVE, HUBNERA, SASKOVE	HeLa
1958	COOK et JACOBS	17 tissus trypsinés et 18 souches en lignée continue
1962	KAUFMAN et MALONEY	Rein de singe trypsiné

2) **Leishmania donovani**

Les recherches sur l'installation, la multiplication et l'entretien des Protozoaires en cultures de tissus ont été très nombreuses, en particulier les Hémoflagellés et plus encore les Trypanosomidés ont fait l'objet de travaux multiples. Malgré cela l'application de la technique a été relativement peu utilisée pour les **Leishmania** alors qu'elles pourraient logiquement apparaître comme étant un des meilleurs exemples possibles de cette application à des parasites comportant une phase intracellulaire.

YEN et CHUNG en 1934 ont essayé d'installer **L. donovani** dans des explants de cerveau d'embryon de poulet en goutte pendante. Ils ont obtenu de nombreuses formes **Leptomonas** à 20° C mais pas de formes **Leishmania** à 37° C.

WEINMAN en 1939 reprit ces essais à partir d'explants d'organes de Cobaye et obtint des formes leishmanoïdes de **L. tropica,** mais les résultats ne furent ni bons, ni convaincants.

GAVRILOV et LAURENCIN en 1938 obtinrent quelques résultats avec **L. donovani** à partir d'explants de rate de Hamster.

PAI et HU en 1941 répétèrent les expériences des auteurs précédents en goutte pendante avec des cellules de Poulet, Hamster et Homme et observèrent que des phagocytes étaient occupés par **L. donovani.**

TCHERNOMORETZ en 1946 obtint de meilleurs résultats avec **L. donovani** en explants de rate de veau enrobés de plasma à partir des formes **Leptomonas** de culture. Il aurait après 9 jours observé des formes intra- et extracellulaires.

FELDMAN-MUHSAM et HALBERSTRAEDER en 1946 également ont étudié les effets des rayons X sur **L. tropica** en culture de tissus.

HAWKING en 1948 explora les possibilités de la technique sur l'étude de la phase intracellulaire de **L. donovani.** Il partit comme de nombreux auteurs précédents d'explants de rate de Hamster infectée enrobés de sérum de lapin. Les explants poussaient bien et après quelques jours des macrophages et des monocytes dispersés parmi les fibroblastes contenaient des parasites leishmaniformes dégénérant après une quinzaine de jours.

PIPKIN fit une excellente revue bibliographique concernant les travaux entrepris jusqu'en 1960 sur les Protozaires en culture de tissus, il étudia lui-même cette question avec **L. donovani.**

PULVERTAFT et HOYLE en 1960 firent une étude cinématographique de la pénétration des **L. donovani** dans les monocytes.

a) *Matériel et Méthode*

Souche de Leishmania. — La souche de **L. donovani** utilisée a été fournie par Mr. J. COLAS-BELCOUR qui l'a entretenue sur Hamster depuis plus de 10 ans par passages espacés d'environ 3 mois.

Préparation des Leishmania à ensemencer. — Nous partons de Hamsters infectés chez lesquels nous prélevons stérilement la rate et le foie. Après contrôle de positivité par coloration d'appositions et de frottis, nous faisons un broyat aux ciseaux à partir d'un petit fragment de rate dans de l'eau physiologique ou du liquide de Hanks.

Ensemencement des Leishmania. — Nous avons fait 48 heures auparavant un repiquage de la souche 503 en tubes à lamelle et en flacons. Une ou plusieurs gouttes de suspension de broyat dans le liquide sont ensemencées dans les tubes et les flacons contenant la culture cellulaire.

1 goutte pour un tube à lamelle,
5 gouttes pour un flacon de 60 ml,
10 gouttes pour un flacon de 250 ml.

On porte à l'étuve à 37° C. On fait ainsi une série de tubes qui permettent de contrôler l'évolution des cultures en fonction du temps. On conserve les flacons pour les repiquages, en contrôlant au préalable leur positivité à l'aide d'une lamelle placée auparavant à l'intérieur.

b) *Résultats*

Nous avons fait ainsi toute une série d'expériences qui ont toujours donné les mêmes résultats.

La pénétration des **Leishmania** dans les cellules est pratiquement immédiate et la multiplication intracellulaire commence aussitôt (fig. 23). Pour nous rendre compte du degré d'infestation nous calculons le pourcentage de cellules parasitées par rapport au nombre de cellules en des niveaux différents régulièrement espacés sur les lamelles (tous les 4 mm). La proportion de cellules parasitées va de 20 % le 2e jour à 80 % le 7e.

Les flacons ont été trypsinés à intervalles réguliers et repiqués sur flacons et tubes à lamelle de contrôle. Les passages suivants ont été faits en plusieurs rameaux à intervalle de 10, 15 et 21 jours en changeant le milieu chaque semaine. En prenant le rythme de 3 semaines nous avons pu conserver 5 mois des parasites dans des cultures.

Des cellules ont été trypsinées lors du 4e repiquage et inoculées au Hamster. Trois mois après sur les animaux sacrifiés on note une rate infectée.

c) *Observations*

Jusqu'à présent les divers travaux partaient d'explants d'organes, de rate de Hamster en particulier, et ne conduisaient qu'à des résultats préliminaires sur la pénétration des **Leishmania** dans les macrophages et monocytes ainsi que sur leur multiplication transitoire dans ces éléments.

Nous avons entrepris d'expérimenter d'une façon différente. Au lieu d'employer des explants primaires de l'organe infecté, nous avons employé des cellules en lignée continue, cellules qui ont été infectées à partir d'organes atteints et ensuite après avoir constaté l'installation et la multiplication des **Leishmania** dans les cellules, elles ont été entretenues dans la forme **Leishmania** normalement présente chez l'hôte vertébré en particulier dans les organes profonds en faisant une série de repiquages. Nous sommes arrivé ainsi à faire des repiquages de forme **Leishmania** comme on le fait avec une culture de formes **Leptomonas** sur milieu NNN ou d'une culture d'Amibes en milieu diphasique au Ringer-sérum-amidon de riz.

3) **Leishmania tropica**

Nous avons utilisé la souche BO (M. J. COLAS-BELCOUR, Institut Pasteur, Paris) cultivée en milieu NNN. Après inoculation à un tapis cellulaire, on voit dans les jours suivants des formes **Leishmania** extra ou intracellulaires et des formes **Leptomonas** intracellulaires.

4) **Leishmania enrietti**

Il s'agit là d'une **Leishmania** de grande taille isolée au Brésil en 1948 par MUNIZ et MEDINA. Cette **Leishmania** est spécifique du Cobaye et donne, chez cet animal, des lésions cutanées.

Nous avons utilisé la souche entretenue par M. J. COLAS-BELCOUR. Le fond d'un chancre auriculaire est lavé au sérum phsiologique. On prélève par grattage et aspiration à la pipette de nombreux parasites. Ils sont inoculés dans des tubes à lamelle pourvus d'un tapis cellulaire de 48 heures. A condition de placer les tubes ainsi inoculés à 36° C et non plus à 38° C, on

peut voir la pénétration et la multiplication des **L. enrietti** dans les cellules (fig. 24).

Il faut remarquer que ce parasite est absolument spécifique du Cobaye et qu'il n'a jamais pu, jusqu'ici, être transmis à aucune espèce animale.

5. **Trypanosoma cruzi**

De nombreux expérimentateurs ont cultivé **T. cruzi** à partir d'explants d'organes d'animaux contaminés ou sur lignée continue (PIPKIN 1960, FROMENTIN, 1961). A notre tour nous avons repris cette expérimentation en contaminant nos cellules.

Des organes de Souris inoculées avec **T. cruzi** (rate, foie, cœur) ont été broyés aux ciseaux en milieu physiologique et inoculés sur un tapis de cellules 503. Nous n'avons pas pu constater le passage à l'intérieur des cellules.

T. cruzi cultivé en milieu NNN a été inoculé à un tapis cellulaire. On peut voir deux jours après la forme **Leptomonas** dans le milieu et des formes **Leishmania** à l'intérieur des cellules.

6) **Conclusion**

De l'étude qui précède nous voyons tout l'intérêt pratique de la souche en lignée continue 503, dérivée du sarcome de Sticker, tumeur réticulo-histiocytaire.

Le caractère réticulo-histiocytaire est conservé « in vitro » après un grand nombre de passages. Des parasites qui chez leur hôte mammifère sont hébergés par des cellules appartenant au système réticulo-histiocytaire peuvent être hébergés « in vitro » par des cellules de même origine et qui ont conservé les propriétés du système. Ils peuvent pénétrer dans les cellules et s'y multiplier. A partir de ce moment deux perspectives d'applications pratiques s'offrent à nous.

— On peut utiliser cette souche pour des recherches pharmaco-dynamiques « in vitro » d'un genre spécial, l'action de la drogue ne se produisant pas seulement sur le parasite lui-même, mais l'ensemble parasite et cellule-hôte.

— Nous avons été orientés par l'idée de conserver ces parasites « in vitro » et de les entretenir sur cellules comme ils le seraient sur un animal. Il y a là un procédé élégant de conservation des souches. Nous avons montré que le procédé est réalisable en ce qui concerne notre souche pour **Toxoplasma gondii** et **Leishmania donovani.** Nous pensons que la méthode pourrait être appliquée à d'autres parasites. Elle éviterait les passages sur l'animal qui sont aléatoires.

C. — GREFFE DES CULTURES CELLULAIRES

I. — TRAVAUX ANTERIEURS

Nous n'avons à notre connaissance qu'une publication dans laquelle les auteurs ont essayé de greffer des cultures de tissus de la tumeur de Sticker à des chiens. En 1960 LAGNEAU et CARTAUD ont fait pousser « in vitro » cette tumeur par la méthode des explants sur plasma de poule. A partir d'une culture de 3 semaines la partie primitive de l'explant est retirée, les cellules sont grattées et remises en suspension. Ils les inoculent sous la muqueuse vestibulaire avec ensuite quelques scarifications. Une 2e chienne a été inoculée de la même façon avec le surnageant de la culture. Le résultat a été négatif.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons fait 2 groupes d'expériences, d'une part des greffes hétérologues de notre souche 503 sur les petits rongeurs de laboratoire et sur le Chacal, d'autre part des greffes homologues sur le Chien. Chez cet animal nous avons utilisé d'autres souches en plus de la 503.

1. — GREFFES HETEROLOGUES

a) MATERIEL ET METHODE

Animaux

Nous nous sommes servi d'animaux de même provenance que lors de nos expériences de greffes hétérologues de sarcome de Sticker. Nous avons aussi utilisé des chacals du printemps 1962 fournis gracieusement par le Parc Zoologique d'Alger.

Cultures cellulaires

Nous avons utilisé notre souche 503 entre les 49e et 84e passages. Les cultures faites dans des flacons de Roux de 600 ml étaient trypsinées du 6e au 8e jour. Nous avons employé pour chaque série expérimentale de 1 à 3 flacons. Les cellules étaient trypsinées, puis centrifugées. Le culot était repris avec 1/4 à 1/2 ml du milieu qui avait servi à la culture et que nous avions mis en réserve avant la trypsination.

Méthode

La méthode employée a été la même que pour les inoculations de sarcome de Sticker trypsiné. Les animaux étaient endormis. L'œil désinfecté, insensibilisé, était ponctionné avec une aiguille lancéolée .La suspension était introduite à l'aide soit d'une pipette Pasteur à bout effilé (Rat, Souris), soit d'une seringue à insuline (Cobaye, Lapin, poche du Hamster). L'inoculation intracérébrale était identique.

Les chacals ont été inoculés dans le derme de la vulve ou du fourreau.

Hamsters et chacals ont reçu le jour de l'inoculation respectivement 2 et 250 mg de cortisone, injection renouvelée 8 jours après.

Contrôle de méthode

Dans le but de contrôler la méthode de greffe nous avons inoculé la souche KB dans l'œil du Rat et du Cobaye.

Le tableau suivant résume les expériences :

	Œil	Cerveau	Poche jugale	Derme	Péritoine
Rat	75	15			
Souris	39	19			9
Souriceau		44			
Hamster		10	16		
Cobaye	12				
Lapin	10				
Chacal				3	
Rat KB	9				
Cobaye KB	8				

b) RESULTATS

Dans l'ensemble comme nous l'avons déjà vu pour les greffes hétérologues du sarcome de Sticker les résultats ont été décevants.

Les inoculations dans l'œil du Lapin, du Cobaye, dans le péritoine de la Souris et la poche jugale du Hamster ont été négatives.

Chez le Chacal nous avons noté la persistance d'un petit nodule de 1 à 2 mm au point d'injection pendant 3 semaines puis il y a eu disparition. Nous n'avons pas fait d'examen histologique ni cytologique.

Les rats et les souris inoculés dans le cerveau ont survécu longtemps. Seules quelques souris sont mortes dans la semaine qui a suivi l'injection, elles ont montré une hémorragie méningée sans trace de cellules néoplasiques.

Inoculation dans l'œil

Au bout de quelques jours on aperçoit une petite zone blanche dans

la chambre antérieure qui va en croissant et qui envahit toute la chambre en 3 semaines, puis elle décroît pendant un mois ; il reste un léger trouble à l'intérieur et souvent une opacité du cristallin. A l'histologie nous n'avons noté que dans 2 cas la persistance des cellules tumorales pendant 2 mois sans avoir cependant la formation d'un nodule tumoral.

Inoculation témoin de la souche KB

Les cobayes n'ont pas présenté de troubles. Par contre chez 2 rats sur 8 nous avons observé en 15 jours l'envahissement de la chambre antérieure par les cellules tumorales.

2. — GREFFES HOMOLOGUES

a) MATERIEL ET METHODE

Animaux

Comme pour les passages en série de notre souche de sarcome de Sticker greffée nous avons employé des chiens qui dans leur majorité provenaient de la fourrière municipale d'Alger, âgés de 2 à 5 ans, en bon état de santé. Dans quelques cas nous avons pu avoir des chiots de 1 jour à 1 mois (25 sur 81).

Souches de cultures cellulaires

— **Souches 264 et 480 :** Au début de nos expériences de culture « in vitro » du sarcome de Sticker, nous avons cherché à inoculer chez des jeunes les cellules cultivées et trypsinées, mais nous n'avons pu le faire que sur une petite échelle.

— **Souche 503 :** Pendant la première année de la culture de cette souche nous n'avons pu inoculer que très peu de chiens du 20e au 30e passage, les circonstances étaient telles qu'il était difficile de se procurer des animaux ; le petit nombre de chiens que nous avons pu avoir a été réservé à l'entretien de la souche de Sticker greffé. Les expériences de greffes de cultures de tissu n'ont pu être reprises qu'à partir du 55e passage.

— **Souche 579 :** Dans le but d'étudier le comportement des cellules lors des premiers repiquages, nous avons créé une nouvelle souche 579 suivant la méthode qui avait réussi avec la souche 503. On a effectué 13 passages consécutifs. La souche s'est éteinte au 14e passage contaminée par un parasite endo-cellulaire que nous avons identifié à Toxoplasma gondii.

— **Souche 602 :** Dans le même esprit nous avons créé une troisième souche en mars 1963. Faute d'animaux à inoculer nous n'avons pas cherché à l'entretenir au-delà du 4e passage.

Méthode

Comme pour les greffes hétérologues nous avons utilisé des flacons de Roux qui nous fournissaient de 20 à 30 millions de cellules. Au début les cellules trypsinées ont été lavées de leur trypsine dans du liquide de Hanks ou dans le milieu de culture, puis reprise dans un faible volume de liquide. Par la suite les cellules n'ont plus été lavées, mais le culot de cellules trypsinées était repris directement avec le milieu de culture.

Les cellules ont été inoculées avec une seringue à insuline. L'injection a été faite dans la chambre antérieure de l'œil, la muqueuse de la verge, celle du vagin, dans le derme du fourreau et de la vulve, dans les ganglions inguinaux superficiels. Dans la muqueuse de la verge l'inoculation était faite entre l'extrémité du gland et les bulbes, dans celle du vagin à 1 cm du bord vulvaire.

Dans certains cas les animaux ont reçu des injections de Cortisone ou d'Hydrocortansyl à des doses variables à une semaine d'intervalle.

Certains mâles ont reçu 2 injections de Stérandryl ou une de Stérandryl-retard.

Dans un cas nous avons ajouté aux cellules au moment de l'inoculation 150 U. d'Hyaluronidase.

Les expériences sont résumées dans les tableaux suivants.

Inoculation	1 jour Chiots à 2 mois	Adultes mâles	Adultes femelles
Derme région génitale	26	2	7
Intra-oculaire		3	4
Muqueuse de la verge		27	
Muqueuse du vagin			6
Ganglion inguinal			1
Contrôle cellules trypsinées		2	1
Contrôle du milieu		2	1
TOTAL	26	36	20

b) RESULTATS

1. **Inoculation intra-oculaire**

Au bout de quelques jours le léger trouble provoqué par la suspension cellulaire a disparu. L'œil est redevenu transparent. Chez un seul chien a persisté un petit grain blanc de 2 mm au milieu de la chambre antérieure de l'œil. Il a disparu le 2e mois.

2. **Inoculation intradermique**

Chez la plupart des chiots et des chiens adultes nous avons pu voir une petite élevure déformer le profil de la peau, dure à la palpation, au point d'inoculation, du volume de 1 à 2 mm. Nous n'avons pas fait d'analyse histologique, ces granules ayant disparu au bout d'un mois.

3. **Inoculation dans la muqueuse génitale externe**

Nous n'avons obtenu de résultats tangibles qu'avec la muqueuse des organes génitaux externes. Il ne faut pas oublier que cette muqueuse est le siège de la maladie à l'état naturel.

Les lésions peuvent se présenter en 3 stades :

Stade 1. — Chez 7 mâles et une femelle nous avons constaté dans les jours qui ont suivi l'inoculation la formation d'une petite papule dure de 6 à 10 mm de diamètre, 1 à 2 mm de hauteur et située au point d'injection (Figure 25). Cette papule était rouge et dans 2 cas s'est nécrosée en son centre. Il y a eu régression au bout de 3 semaines.

Nous n'avons pas fait d'examen histologique de ces élevures chez les mâles. Cependant chez la femelle on pouvait voir le 8e jour une papule de 5 mm déformant la paroi du vagin et à la palpation on avait la sensation d'un grain de plomb quelques jours après. Cet animal étant mort le 20e jour nous avons prélevé la lésion et fait son examen. Sous l'épiderme se trouvait un nodule sphérique de 4 mm de diamètre constitué de cellules nécrosées en majeure partie. Seulement à la périphérie persistaient des cellules à caractère d'histiocyte.

Par contre, chez plusieurs chiens morts un ou deux mois après l'inoculation, nous avons fait des coupes histologiques au niveau du point d'inoculation que l'on pouvait repérer grâce à une minuscule cicatrice. Il n'y avait plus de traces de cellules tumorales sous la muqueuse.

Stade 2. — Chez 4 mâles et 1 femelle après apparition transitoire d'une papule au point d'inoculation, nous avons vu sur la base du pénis et les parois du fourreau et de la vulve apparaître de petites granulations de 1 mm qui par la suite atteignaient 2 à 3 mm de diamètre, ayant l'aspect de petites perles translucides au début, devenant rouges en 10 à 15 jours et à ce moment saignant facilement. Les lésions sont restées stationnaires pendant plusieurs mois (Figure 26).

Structure des lésions. — La muqueuse qui recouvre le pénis normal est papillaire. De place en place on voit de petits îlots lymphoïdes de 200 à 400 μ de diamètre. Ils sont plus nombreux à la base de la verge qu'à son extrémité, on les voit aussi sur le fourreau nombreux. Les granulations que

Inoculation au Chien des cultures cellulaires de sarcome de Sticker

N° de l'exp.	Nombre de chiens		Age des chiens	N° du passage des cultures		Age des cultures	Nombre de cellules inoculées par animal	Cortisone	Stérandryl	N° des chiens	Lieu de l'inoculation	Résultats
	M	F		503	Autres souches							
273	1	2	1 mois		264-4e	9 jours	3.10^6	3 x 50 mg			Derme Fourreau et vulve	0
490	2	1	2 »		480-5e	8 »	4.10^6				»	0
527		2	7 »	21-22-23		10 à 15 »	10.10^6				»	0
528		2	7 »	»		11 à 13 »	»				»	0
534	1	1	23 jours	27 à 30		8 à 10 »	50.10^6				» »	0
547	2	3	Adultes	55		7 »	6.10^6			216 à 220	Œil	0
559	2	3	»	55		10 »	12.10^6	3 x 0,25 g		221 à 225	Derme Fourreau et vulve	0
561	2	3	»	59		7 »	12.10^6			Mêmes chiens que 547	»	0
568	1	1	»	59		9 »	10.10^6			233 234	Œil	0
569	1		»	62		11 »	30.10^6			235	Muqueuse verge	papule
570	2		»	65		8 »	25.10^6	2 x 0,25 g		236 237	»	» »
575	3		»	68		6 »	15.10^6	6 x 0,25 g	2 x 25 mg	238 239 240	»	» » »
577	3	4	1 jour	61 à 66		5 à 10 »	6.10^6			241 à 247	Derme Fourreau et vulve	0
580	1		Adulte		contrôle cellules tumorales trypsinées		15.10^6			251	Muqueuse verge	tumeur

Inoculation au Chien des cultures cellulaires de sarcome de Sticker (Suite)

N° de l'exp.	Nombre de chiens		Age des chiens	N° du passage des cultures		Age des cultures	Nombre de cellules inoculées par animal	Cortisone	Stérandryl	N° des chiens	Lieu de l'inoculation	Résultats
	M	F		503	Autres souches							
583	1		»		579-3e	7 »	30.10^6	2 x 0,25 g	2 × 25 mg	252	»	papule puis granulations
584	2		»	67		7 »	20.10^6	»	2 × 50 mg	253 254	»	0 0
585	2		»	67-69		9 à 13 »	25.10^6	»	»	255 256	»	papule puis granulations » »
586	3	4	2 mois	68-70-71		9 à 16 »	15.10^6	2 x 0,25 g		Mêmes chiots que 577	Muqueuse verge et vagin	0
587A	1		Adulte		575-5e	9 »	15.10^6	2x125 mg	50 mg S. retard	257	Muqueuse verge	papule puis granulations puis nodule cutané
587B	1	1	»	69-71		12 à 15 »	20.10^6	»	»	258 259	Muqueuse verge vagin	papule, granulations, ganglions hypertrophiés, nodule nécrosé
588A	1		Adulte		579-6e	11 jours	30.10^6	2x125 mg		260	Muqueuse verge	Papule granulations tumeur transmissible
588B	1	1	»	70-72		11-13 »	25.10^6			261 262	» ganglion inguinal	Papule granulations petit polype 0
592	1	1		73-75-76		12-17 »	25.10^6	4x125 mg		267 268	Muqueuse verge vagin	0 0

Inoculation au Chien des cultures cellulaires de sarcome de Sticker (Suite)

N° de l'exp.	Nombre de chiens		Age des chiens	N° du passage des cultures		Age des cultures	Nombre de cellules inoculées par animal	Cortisone	Stérandryl	N° des chiens	Lieu de l'inoculation	Résultats
	M	F		503	Autres souches							
596	2	2	»	77-78		11-12 »	10.10^6	3x125 mg HC		269 270 271 272	Muqueuse verge vagin	- Papule 0 - Papule » granulations polype
599	2	1			579-XII	10 »	Milieu de culture 10 ml	2 x 125 » HC		273 274 275	Muscle et peau fourreau et base vulve	0
600	2 4	2 3	15 jours 2 »	80		5 »	4.10^6	3 x 125 » HC			Derme fourreau et vulve	0
602	1	1	Adultes		Contrôle cellules tumorales trypsinées		60.10^6			276 277	Muqueuse verge vagin	0 0
605	3		»	79-81-82			25.10^6	2 x 125 » HC		278 279 280	Muqueuse verge	0 0 Papule granulations
610	2		»		602-1	15 »	10.10^6	2x125 mg		281 282	» »	» hypertrophie ganglionnaire »
614	2	2	»	85-87-88		11-20 »	15.10^6			283 286 284 285	Muqueuse verge vagin	0 0 0 0
615				81-89		11-12 »	25.10^6 + 150 unités hyaluronidase			287 288	Muqueuse verge	0 0

Abrév. HC : hydrocortansyl.

nous avons observées correspondent à ces îlots. Ils ont alors un volume plus important et sont constitués de lymphocytes et d'un mélange de cellules réticulaires et de cellules d'allure histiocytaire sur coupes et frottis. Dans certains cas il y a disparition presque totale des lymphocytes et il ne reste plus que des cellules réticulaires.

Stade 3. — Chez 6 mâles et 1 femelle après avoir franchi les stades précédents nous avons eu formation de petits polypes ou d'hyperplasie des ganglions inguinaux ou de tumeurs situées ailleurs.

Un mâle a développé le 3e mois au milieu de granulations un petit polype en fraise de 4 à 5 mm..

Une femelle qui avait présenté un mois après l'inoculation de petites granulations avait 5 mois plus tard un polype rond de 4 mm de diamètre saillant à l'ouverture de la vulve (Figure 27). Ces 2 animaux étaient inoculés avec la souche 503.

Trois mâles inoculés avec des cellules de première explantation ou de la souche 503 ont présenté 3 mois après une augmentation du volume des ganglions superficiels qui atteignaient 3 cm. Notons que un mâle et une femelle inoculés avec les cellules trypsinées qui ont donné les cellules de première explantation précédentes n'ont présenté aucune lésion.

Un mâle inoculé avec les cellules de la souche 579 à son 5e passage a développé un petit nodule sphérique de 1 cm de diamètre sur le plat de la cuisse. Une ponction a révélé la nature des cellules identiques à celles du Sticker. L'animal étant mort brusquement nous n'avons pas pu l'utiliser.

Par contre le chien 260 inoculé avec le 6e passage de cette souche a commencé par développer des granulations qui avaient 3 mm de diamètre le 2e mois. Le 3e mois on sentait à la palpation un nodule de 2 cm à la base de la verge entre celle-ci et le plancher abdominal. Cinq mois après l'inoculation nous avons fait l'exérèse de cette tumeur (Figure 28).

Celle-ci avait la forme d'un œuf de 5 × 3 × 3 cm. Elle était formée d'un tissu rosé, homogène, tendre sous le couteau. Au point de vue histopathologique elle avait indiscutablement l'allure classique du sarcome de Sticker (Figures 29 et 30).

Transmission de la tumeur. — Cette tumeur broyée à la presse de Fischer a été inoculée sous la peau du plat de la cuisse de 3 mâles et d'une femelle.

En 15 jours des nodules se développèrent sur la cuisse ; ils atteignaient la 3e semaine, à notre départ d'Algérie, la taille de 3 cm. Nous avons pu analyser 2 de ces tumeurs .Il s'agissait de sarcome de Sticker classique.

Inoculations de contrôle des cellules trypsinées

Chez 3 chiens nous avons inoculé de la même manière dans la muqueuse génitale des cellules trypsinées dans le but d'établir les souches 579 et 602.

Deux animaux ont été absolument négatifs (602), alors que ceux inoculés avec les mêmes cellules qui avaient poussé 15 jours sur le verre ont présenté des granulations et une hypertrophie des ganglions inguinaux.

Le 3e a développé en 3 semaines une petite tumeur sessile de 1 cm de long sur 3 mm de large au point d'inoculation. Au voisinage de la tumeur

on voyait sur la coupe histologique (l'animal étant mort à ce moment) des îlots lymphoïdes avec hyperplasie réticulaire.

Autres expériences. — L'inoculation des cellules de culture dans un ganglion inguinal et celle du milieu de culture sous la peau ont été négatives.

c) DISCUSSION

Le but de notre expérimentation avait été d'établir une souche de culture cellulaire en lignée continue et admettant dès le départ que les cellules hébergeaient un virus oncogène, nous voulions voir si ce virus se multipliait au fur et à mesure des passages en répétant avec une méthode un peu différente les expériences de STEWART et EDDY avec le virus polyoma.

STEWART et EDDY inoculaient des cultures neuves avec un extrait de tumeur parotidienne de la souris et ensuite réinoculaient d'autres cellules en première explantation avec le surnageant des cultures précédentes. Nous avons fait les passages avec les cellules elles-mêmes de la tumeur. Il pouvait y avoir a priori ou augmentation de la virulence ou diminution avec les passages.

Nous avons inoculé les cellules elles-mêmes et non les surnageants. Pour nous il s'agissait d'un premier temps expérimental. L'étude des surnageants ne devait venir qu'ensuite.

Les circonstances ont été telles que nous n'avons pu faire que ce premier temps expérimental avant d'abandonner notre pays et notre laboratoire.

Il est incontestable que depuis longtemps on a reproduit des tumeurs à l'aide de cultures cellulaires de tumeurs à virus ou non. Dans un tableau nous donnons quelques exemples de ces travaux.

Année	Auteur	Tumeur ou cellules	Origine	Receveur	Résultat
1924	CARREL	Sarcome de Rous	Poule	Poule	+
—	FISCHER	—	—	—	+
1927	FELL et ANDREWES	Sarcome de Jensen	Rat	Rat	+
1928	CARREL et EBELING	Sarcome 10 de Crocker	Rat	Rat	+
		Sarcome de Jensen	—	—	+
1931	KRITSCHEROWSKI et RUBINSTEIN	Angio-sarcome	—	—	+
1933	FISCHER, FISCHER et HOLLMANN	Carcinome de Ehrlich	Souris	Souris	+
1934	BEVERWIJK	Carcinome de Walker	Rat	Rat	+

Année	Auteur	Tumeur ou cellules	Origine	Receveur	Résultat
1936	VERNE, OBERLING et GUERIN	Leucémie érythro-blastique	Poule	Poule	+
1937	FURTH et BREEDIS	—	—	—	+
1939	SUGIURA et COHEN	Sarcome 180	Souris	Souris	+
1943	LEWIS	Tumeur 92	Rat	Rat	+
1948	LEE, BENDER et FRIEDGOOD	Tumeurs diverses	Rat	Embryon de poulet	+
1950	SANFORD et Col.	Fibroblastes embryonnaires	Souris	Souris	+
1952	— —	Hépatome Tum. Thyroïd. Mélanome de Cloudman	— — —	— — —	+ + —
1953	HOTCHIN	Hépatome de Novikoff	—	—	+
1956	FOLEY et DROLET	Sarcome 180	—	—	+
—	HANDLER et FOLEY	KB HeLa	Homme —	Hamster —	+ +
1957	FOLEY et HANDLER	14 souches normales et cancéreuses	Souris et Homme	Hamster	+
1958	FRIEDMANN et FOGH	7 souches normales et cancéreuses	Homme	Rat irradié + cortisone	+
—	CHOUROULINKOV, RIVIERE et OBERLING	GRCH/15	Poule	Poule	—
—	EVANS, HAWKINS, WESTPHAL et EARLE	Epithélium hépatique	Souris	Souris irradiée	+
—	DAWE et LEIGHTON	Réticulo-sarcome	—	Souris	+
1959	Mac ALLISTER et CORIELL	13 souches diverses	Animaux divers	Rat irradié + cortisone	+
—	ROSANOF	Séminome	Chien	Chien	+
—	MANUELIDIS et POND	Glioblastome	Homme	Hamster irradié + cortisone	+

Année	Auteur	Tumeur ou cellules	Origine	Receveur	Résultat
1960	SANG et MAURIN	EPL	Lapin	Lapin	—
—	GUERIN et KITCHEN	6C3HED	Souris	Souris	+
—	SCOTTI, WRYK, DORSEY et SIGEL	KB HeLa	Homme —	Rat irradié + cortisone	+
—	HILWIG	Sarcome	Rat	Rat	+
—	KUTNER et SOUTHAM	HeP II	Homme	—	+
1961	MANUELIDIS	2 souches cancéreuses	Homme	Hamsters et souris	+
		2 souches normales	Singe	irradiés + cortisone	—
—	HAYFLICK et MOORHEAD	Cellules diploïdes	Homme	Hamster	+
1964	J.-A. THOMAS	BHK 21	Hamster	Hamster	+

En faisait abstraction des expériences négatives qui sont passées sous silence par leurs auteurs, on peut dire que souvent les tumeurs cancéreuses cultivées « in vitro » peuvent redonner des tumeurs quand les cellules sont inoculées à des animaux de même espèce ou d'espèces différentes avec ou sans conditionnement par rayons X ou cortisone.

En principe d'après les travaux récents de HAYFLICK et MOORHEAD, les cellules diploïdes normales se différencient des cellules cancéreuses en ce qu'inoculées dans la bajoue du Hamster, elles donneraient un petit nodule qui, après une certaine croissance, régresse, tandis que les secondes donneraient une néoplasie qui pourrait ensuite être transmise en série.

De nos expériences nous retenons le fait que les cellules de culture inoculées chez des animaux d'espèces différentes n'ont pas redonné de tumeur, inoculées chez le Chien elles donnent un petit nodule local qui se nécrose.

Dans un deuxième temps à distance du point d'inoculation et seulement dans le cas de la muqueuse des organes génitaux externes, il y a hyperplasie des îlots lymphoïdes présents normalement dans cette muqueuse. Ces îlots finissent par ne contenir que des cellules réticulo-histiocytaires. La plupart des descriptions cliniques font état comme premiers symptômes du sarcome de Sticker naturel de perles situées à la base de la verge ou dans le vagin. Dans 2 cas nous avons eu formation de polypes.

Dans le cas de passage récent (6e) il y a eu formation d'une tumeur éloignée que nous avons pu transmettre à d'autres chiens.

La souche 579 qui a donné 2 tumeurs était contaminée par un parasite endocellulaire **Toxoplasma gondii.** Nous ignorons si le parasite a joué un rôle dans l'apparition de ces tumeurs. Toujours est-il que nous ne l'avons pas retrouvé à l'examen cytologique de ces tumeurs.

Nous pensons que dans la nature, lors du coït, l'agent de la tumeur provoque une réaction des cellules réticulaires des îlots lymphoïdes de la muqueuse génitale. Ce n'est pas le simple dépôt de cellules vivantes sur une muqueuse congestionnée qui peut permettre une greffe classique tissulaire. Il faut qu'il y ait franchissement de la barrière de l'épithélium. Pendant 50 ans on a admis que le sarcome de Sticker était le résultat d'une greffe de cellules tumorales sur les traumatismes causés à la muqueuse lors du coït. S'il fallait qu'il y ait déchirure de cet épithélium avec inflammation consécutive automatique chaque fois qu'un mâle monte une femelle, toute reproduction serait arrêtée au moins chez les mammifères.

Nous pensons que la muqueuse reste une barrière pour des cellules néoplasiques même isolées (or elles se détacheront en général en placards de cette tumeur friable) tandis qu'au contraire elle ne l'est pas pour des particules virales et ces particules ont vraisemblablement une attirance particulière pour les cellules réticulaires présentes normalement.

CHAPITRE III

LES CHROMOSOMES DANS LE SARCOME DE STICKER

I. — TRAVAUX ANTERIEURS

A. — Les chromosomes chez le Chien

Le premier auteur qui a fourni un chiffre pour l'évaluation du nombre des chromosomes chez le Chien est RATH en 1894. Pour cet auteur ce nombre est compris entre 32 et 64.

Pour MALONE en 1918 la spermatogonie du Chien comprend 21 autosomes et 1 chromosome sexuel.

En 1928 MINOUCHI a étudié la spermatogénèse chez le Chien. L'ovogonie compte 78 chromosomes (76 télomitiques et 2 atélomitiques), la spermatogonie en compte 78 (76 + X + Y), les spermatocytes 39 (38 + X ou Y). Cet auteur a remarqué que les figures de division du stroma ovarien se caractérisent par un plus petit diamètre de la plaque équatoriale et par un nombre indéfini de chromosomes.

MAKINO en 1949 et 1952 indique le nombre diploïde du Chien calculé à partir des spermatogonies : 78.

En 1953 HSU et POMERAT étudient en culture « in vitro » différents tissus embryonnaires d'animaux de laboratoire : Souris, Cobaye, Chien. Ils utilisent la méthode de HUGUES du traitement hypotonique des cellules avant fixation. Ils mettent en évidence l'aneuploïdie chez ces animaux. Chez le Chien ils ont compté 113 mitoses de culture de poumon embryonnaire : 67 % présentent un caryotype de 78, le reste allant de 72 à 82 chromosomes.

TAKAYAMA en 1958 à partir de cultures de poumon indique aussi le nombre diploïde de 78 et il en trace l'idéogramme.

En 1959 AWA, SASAKI et TAKAYAMA publient une étude « in vitro » des chromosomes somatiques de quelques mammifères dont le Chien. A partir de cultures de rate pour 15 métaphases bloquées par la colchicine ils donnent le nombre diploïde de 78.

B. — Cas du sarcome de Sticker

WATANABE et AZUMA en 1956 ont étudié les cellules du liquide qui se trouve dans les infractuosités et à la surface des tumeurs vénériennes.

Ils trouvent que le nombre de chromosomes de ces cellules oscille entre 40 et 67, avec une moyenne de 54-56.

En 1958 TAKAYAMA révèle l'existence d'un « stem-cell lineage » dans la tumeur vénérienne infectieuse du Chien. Il reprend le travail de WATANABE et AZUMA en utilisant comme matériel les cellules du liquide de la surface des tumeurs chez une chienne. Sur 146 cellules tumorales étudiées 32 % avaient 60 chromosomes, les chiffres oscillant entre 54 et 66. L'idéogramme de la fréquence modale est caractérisé par l'existence constante de 14 chromosomes en V ou en J et 46 « rodshapeds ».

En 1961 TAKAYAMA et MAKINO avec la même méthode étudient 5 cas de tumeurs vénériennes du Chien issues de différentes localités (4 femelles et 1 mâle). 4 cas sont caractérisés par un nombre de chromosomes de 59. Dans un autre (femelle) 2 modes sont révélés à 59 et 60. Dans tous les cas on compte 16 chromosomes métacentriques, les autres sont acrocentriques.

En 1963 MAKINO a repris et complété les travaux de l'Ecole Japonaise (17 cas étudiés) pour en dégager l'idée générale que le sarcome de Sticker est caractérisé par un caryotype particulier à 59 chromosomes. Il a constaté de plus que la quantité de DNA du noyau des cellules de cette tumeur est plus importante que celle des cellules normales du Chien.

C. — **La chromatine sexuel**

En 1949 BARR et BERTRAM ont publié un travail princeps dans lequel ils mettaient en évidence dans les neurones du Chat un corpuscule qu'ils ont appelé satellite nucléolaire et qui était présent chez les femelles et non chez les mâles. BARR et ses collaborateurs ont étendu leurs travaux à d'autres animaux et en particulier à l'homme et surtout à d'autres tissus que le tissu nerveux. Le terme de satellite nucléolaire a été abandonné en faveur de ceux de « chromatine sexuelle » et de « corpuscule de BARR ». Ceci est plus naturel car on s'est aperçu que ce corpuscule est le plus souvent situé à la périphérie du noyau et non accolé au nucléole. On admet que le corpuscule de BARR représente la fraction d'hétérochromatine d'un chromosome sexuel de la femelle.

La chromatine sexuelle dans les tumeurs. — Les travaux sur la chromatine sexuelle portent surtout sur des tissus normaux. Nous rappellerons que SOHVAL et GAINES en 1956 ont recherché la chromatine sexuelle dans 156 néoplasies bénignes et malignes de l'homme (106 chez la femme et 50 chez l'homme). Ils l'ont observée dans 25 cas de tumeurs chez la femme et 1 cas de tumeur masculine. La même année MOORE et BARR trouvent la chromatine sexuelle dans 100 % de leur matériel provenant de tumeurs bénignes de la femme, mais avec une technique meilleure.

En 1957 les mêmes auteurs ont étudié la fréquence de la chromatine sexuelle dans les tumeurs malignes. Chez le mâle à l'exception des tératomes du testitule, tous les spécimens contenaient des noyaux mâles. Chez la femme, sur 76 tumeurs étudiées, la chromatine sexuelle était partout présente, mais dans le tiers de ces tumeurs la proportion était plus faible que dans les tissus non malins. Ils admettent que la chromatine sexuelle est présente avec un fort pourcentage dans les noyaux des cellules des tumeurs bien différenciées, avec un faible pourcentage dans les tumeurs peu différenciées ou indifférenciées.

Depuis on tend à admettre (TAVARES 1962) que les néoplasmes malins

et bénins ont un sexe nucléaire identique au porteur, l'exception la plus importante étant celle des tératomes.

La chromatine sexuelle dans les cultures de tissus. — La recherche de la chromatine sexuelle dans les coupes de tissus n'est pas toujours commode. Dans une certaine mesure elle est tributaire de la fixation et du mode de coloration. Il était tentant de l'appliquer aux cultures cellulaires où l'on a un noyau entier entre lame et lamelle tandis que dans les coupes histologiques on n'a que des tranches de noyau ce qui statistiquement rend la recherche plus difficile. BURLINGTON le premier en 1959 a étudié la chromatine sexuelle sur des explants primaire de rein de chiens et de chats femelles. Il l'a trouvée présente dans 40 % des noyaux. La même année FRACCARO et LINDSER l'ont mise en évidence dans des embryons humains cultivés en boîtes de Petri. Ces auteurs ont mis en évidence chez le mâle des corps hétérochromatiques semblables à la chromatine sexuelle pour la coloration et la forme mais non pour la taille. Chez la femme la chromatine sexuelle a pu être localisée n'importe où dans le noyau. MILES en 1960 l'a recherchée dans des cultures d'amnios et l'a observée avec une fréquence de 51 à 85 % chez les femelles. En ce qui concerne les cellules cancéreuses ORSI et RITTER l'ont cherchée dans les cellules de la souche HeLa et dans une souche de rein de lapin « Drew line » sans résultat. Ils pensent que du fait de l'ancienneté de la culture il peut y avoir eu perte ou masquage. Par contre ils l'ont observée dans une souche de cellules dérivée de tumeur mammaire humaine.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons cherché à établir le caryotype de notre souche 503 et, cette souche présentant de nombreuses anomalies chromosomiques, nous avons été amené à étudier les cellules du sarcome de Sticker cultivées « in vitro » en première explantation et à titre de contrôle nous nous sommes penché sur le caryotype des cellules somatiques du Chien normal cultivées de la même façon. Dans un temps ultérieur nous avons étudié le corpuscule de Barr.

Dans l'exposé que nous présentons, nous suivrons un ordre différent par esprit didactique.

A. — MATERIEL ET METHODE

1. **Tissus**

a) *Tissu normal du chien*

Nous avons utilisé d'une part le rein et la rate de jeunes chiens âgés de 5 à 6 mois, d'autre part le rein d'une portée de chiots nouveau-nés âgés de 4 jours.

Nous avons fait :

3 cultures de rein mâle chez l'impubère et 2 chez le nouveau-né,

1 culture de rein femelle chez l'impubère et 2 chez le nouveau-né,

1 culture de rate mâle chez l'impubère.

b) *Sarcome de Sticker*

Nous avons mis en culture :

2 tumeurs greffées chez le chien mâle : E579 et E602,

1 tumeur greffée chez le chien femelle : E617,

1 tumeur greffée chez le chien mâle : E622 et résultant de l'inoculation au chien des cellules de la souche E579.

Dans le cas des expériences 602, 617 et 622 les cellules examinées étaient des cellules de première explantation, dans celui de l'expérience 579 les cellules provenaient du 10e passage en flacon.

c) *Souche 503*

Les cellules examinées étaient issues pour les lignées
β2A : du 90e au 97e passage,
β2B : du 84e au 96e passage ainsi que des 138 et 140e
β2 ter : du 80e au 91e ainsi que des 107 et 136e.

2. **Méthode**

Nous nous sommes servi de la méthode développée par HUGUES en 1952 et par HSU et POMERAT en 1953 basée sur l'action d'une solution hypotonique sur les cellules en mitose, mitoses bloquées en métaphase par la colchicine.

Le rein et la tumeur de Sticker ont été trypsinés selon la méthode classique, la rate selon notre méthode au Subtosan. Les cellules ont été cultivées en tubes à lamelle ou en flacon.

Dans les cas des souches 503 et 579 nous avons inoculé des tubes à lamelle au cours des passages de routine de façon à multiplier l'échantillonnage.

Après fixation des cellules sur le verre, lors de la phase de multiplication, nous avons introduit dans les tubes une solution au 1/10 000 de colchicine en sérum physiologique. Nous avons fait varier les doses de 1 à 5 µg le plus souvent nous avons employé 2 µg de colchicine par ml de milieu de culture.

Les tubes ont été laissés à l'étuve pendant des temps variables de 6 à 18 heures.

Le choc osmotique était provoqué par la solution hypotonique : Liquide de Hanks 1, Eau 4 pendant 10 à 20 minutes.

Après rejet les cellules étaient fixées pendant 10 à 20 minutes au Carnoy B (Alcool 3 - Acide acétique 1), puis les lamelles étaient retirées et selon ROTHFELS et SIMINOVITCH mises à sécher à l'étuve.

Dans des essais ultérieurs nous avons employé une autre méthode, celle que MOOREHEAD a mise au point au Wistar Institute pour l'étude des cellules diploïdes et nous l'avons comparée avec celle des tubes à lamelle sur le même matériel.

Nous avons utilisé les techniques de coloration suivantes : Orcéine acétique, Feulgen, Gallocyanine-alun de chrome, Giemsa. Les trois premières méthodes donnent des colorations délicates, mais nous avons préféré pour notre compte personnel la teinte violacée du Giemsa et toutes nos mesures ont été faites sur matériel coloré au Giemsa.

Pour compter et identifier les chromosomes nous avons employé deux méthodes :

a) Dans une première série de numérations nous avons photographié les mitoses sur le Panphot de Leitz (objectif à immersion 90 puis 100, Oculaire 8x, film Gévapan, Isopan ou Kodachrome en 24 × 36 mm). Les positifs ont été tirés en 9 × 12 cm. Les chromosomes examinés à la loupe ont été pointés sur une cellophane transparente appliquée sur la photo et comptés ainsi.

Du fait de l'épaisseur des chromosomes nous avons eu presque toujours un léger flou qui a rendu parfois difficile leur numération.

b) Dans une deuxième série de mesures pour avoir plus d'exactitude nous avons dessiné les mitoses à la chambre claire. Nous considérons cette méthode comme plus exacte que la précédente, du moins en ce qui concerne les cellules comportant un nombre considérable de chromosomes 80, 150, 200 ou plus.

3. Recherche de la chromatine sexuelle

Nous n'avons entrepris ces recherches qu'après avoir étudié le caryotype des cultures de sarcome de Sticker. Nous avons alors repris d'anciennes lames colorées provenant soit de cultures de sarcome de Sticker, soit de cultures d'organes normaux de Chien tels que rein, rate ou de tumeurs diverses.

Par un hasard auquel nous sommes étranger les premières tumeurs de Sticker mises en cultures appartenaient à des femelles, puis toute une série a été faite sur des tumeurs greffées chez des mâles.

Dans des cultures datant de 4 à 5 ans seules les lames colorées à l'hématoxyline sont restées valables pour l'observation, les autres, en particulier celles colorées par la méthode de Feulgen, sont partiellement décolorées. Nous n'avons tenu compte que de la chromatine sexuelle marginale. En fait les auteurs sont d'accord pour dire que les 3/4 des corpuscules de Barr sont en position marginale ce qui fait que notre marge d'erreur est réduite d'autant.

Pour chaque organe ou tumeur nous avons compté des groupes de 50 cellules en différents champs sur un total toujours supérieur à 200 cellules et avec la moyenne de ces mesures nous avons établi le pourcentage de chromatine sexuelle dans les noyaux.

B. — RESULTATS

a) Cellules somatiques normales du Chien

1° *Etude de l'euploïdie*

Le dénombrement des chromosomes des cellules diploïdes du Chien, étant donné leur nombre élevé, 78, est déjà délicat, dénombrer ceux des cellules polyploïdes devient un problème difficile. Nous en avons dessiné un certain nombre.

Pour avoir une idée de l'euploïdie nous avons compté les mitoses avec un compte-cellules quand elles défilaient sous notre objectif et nous pointions au passage les cellules tétraploïdes ou hexaploïdes après une brève évaluation.

Les chiffres obtenus sont résumés dans les tableaux suivants.

Ploïdie	Rein ♀	%	Rein ♂	%	Rate ♂	%	Total	% moyen
N	2	0,8	4	0,1	9	0,84	15	0,20
2N	2320	96,72	3930	97,75	1004	93,38	7254	97,05
3N	2	0,08	2	0,05			4	0,05
4N	74	3,08	62	1,55	57	5,31	193	2,58
6N	2	0,08	1	0,02	5	0,46	8	0,10
8N			1	0,02			1	0,00
Totaux	2400		4000		1075		7475	

Tableau I : Chiens âgés de 6 mois

Floïdie	Rein ♂	%	Rein ♀	%	Total	% moyen
2N	1003	99,91	856	99,94	1859	99,93
4N	8	0,08	4	0,05	12	0,06
6N	1	0,001			1	0,0005
Totaux	1012		860		1872	

Tableau II : Chiens nouveau-nés

Dans la colonne correspondant à chaque organe étudié nous avons indiqué les chiffres trouvés des différentes ploïdies et dans la colonne parallèle les pourcentages correspondants.

HSU et POMERAT dans leur travail paru en 1953 sur l'euploïdie et l'aneuploïdie chez la Souris, le Cobaye et le Chien n'ont étudié l'euploïdie que chez la Souris, étant donné le grand nombre de chromosomes que l'on doit compter dans les cellules polyploïdes du Cobaye (2N = 64) et du chien (2N = 78). Il faut dire à leur décharge qu'ils ne possédaient pas la technique de dessiccation sur lame des chromosomes qui permet leur étalement dans un plan optique et rend beaucoup plus facile leur dénombrement. Chez l'embryon de Souris ils ont trouvé respectivement 0,8 et 1,6 % de cellules tétraploïdes pour le cœur et le poumon, mais 3,2 % pour la peau, chiffres du même ordre de grandeur que ceux que nous avons trouvé pour les organes du Chien. Le chiffre trouvé pour la rate du Chien qui à première vue paraît plus important n'est pas significatif statistiquement. On remarquera les très

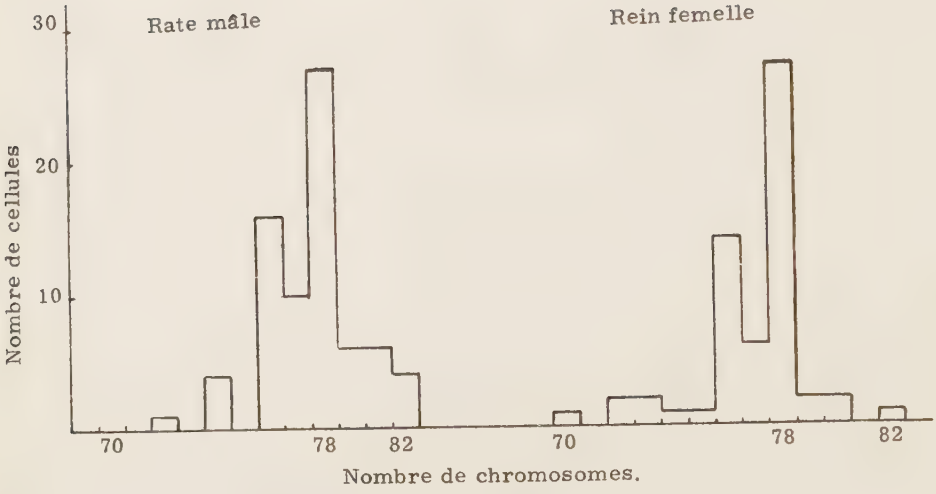
Répartition des chromosomes chez le Chien.

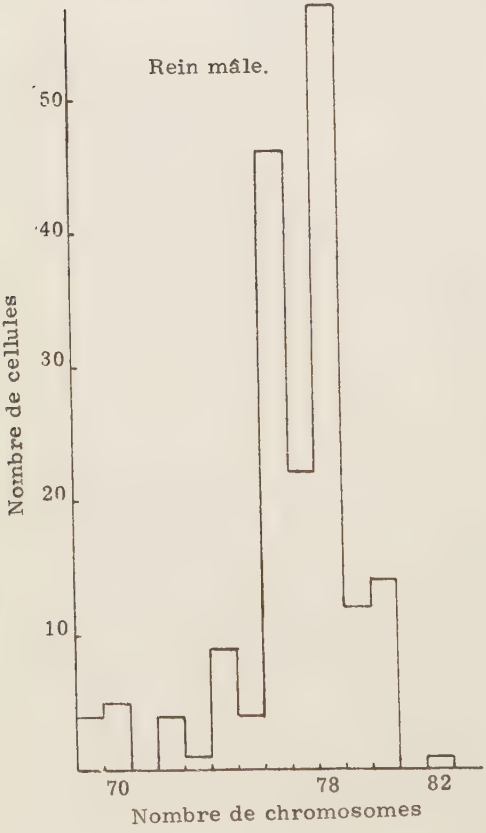
1° Chiots de 6 mois.

Tissu	Distribution du nombre des chromosomes																												Nombre de cellules observées
	<68	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	94	136	138	142	146	148	150	152	154	156	158	160	162	
Rein M	9	1	4	5		4	1	9	4	46	22	57	12	14		1	1				2	1				1	1			194
Rein F	1			1		2	2	1	1	14	6	27	2	2		2		1		1	1			1					1	65
Rate M						1		4		16	10	27	6	6	4				1			1	1	2	2	5	2			88
Total	10	1	4	6		7	3	14	5	76	38	111	20	22	4	3	1	1	1	1	3	2	1	3	2	6	3		1	347

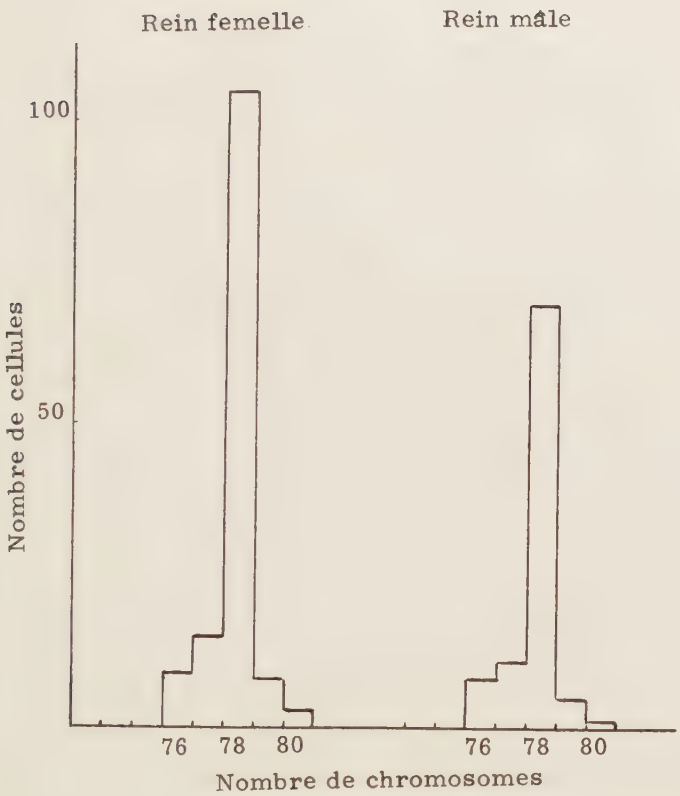
2° Chiots nouveau-nés.

Tissu	Distribution du nombre des chromosomes					Nombre de cellules observées
	76	77	78	79	80	
Rein M	8	11	70	5	1	95
Rein F	9	15	105	8	3	140
Total	17	26	175	13	4	235





Histogrammes de la répartition des chromosomes chez le chien âgé de 6 mois.



Histogrammes de la répartition des chromosomes chez le chien nouveau-né.

faibles pourcentages de cellules polyploïdes observés chez les chiens nouveau-nés.

Nous avons observé à maintes reprises le phénomène décrit par LEVAN et HAUSCHKA en 1953 sous le nom d'endoreduplication. Il s'agissait de cellules tétraploïdes dans lesquelles les chromosomes étaient groupés en doubles paires rangées côte à côte.

2° *Aneuploïdie*

Nous avons été étonné en faisant des dénombrements sur nos photomicrographies de voir l'aneuploïdie importante qui existe parmi les cellules somatiques du Chien « in vitro ».

Comme nous avions des doutes quant à la valeur de nos chiffres, étant donné un léger flou des photos et un chevauchement de certains chomosomes, nous avons recommencé nos mesures avec une chambre claire, l'observation étant ainsi beaucoup plus précise. Nous n'avons compté que des mitoses dont les chromosomes étaient bien dispersés, éloignés les uns de autres au maximum, se chevauchant le moins possible, non altérés et situés à l'intérieur d'une zone cytoplasmique franche (Figures 31 et 32).

Les chiffres trouvés sont réunis dans un tableau et mis en évidence par des histogrammes.

Nous constatons que les histogrammes sont différents suivant que l'on s'adresse au nouveau-né ou au chien impubère de 6 mois.

Le nouveau-né présente 75 % des mitoses avec le nombre diploïde 78, le reste se répartit en deçà et au-delà avec une plus grande proportion de mitoses hypodiploïdes (18,3 %) que d'hyperdiploïdes (7,2 %) et avec un intervalle de variation faible (76 à 80).

Chez l'impubère nous avons un mode principal à 78 chromosomes (36 %) et un mode secondaire à 76 (24 %). Autour de ces deux modes, les cellules se répartissent d'une façon inégale de 78 à 82, de 76 à 65 et même moins chez le rein du Chien. De plus l'allure du graphique n'est pas symétrique. Nous avons dissymétrie dans le sens de l'hypodiploïdie. D'autre part les nombres pairs ont de plus grandes fréquences. Nous trouvons des mitoses à 70, 72, 74 chromosomes, pas à 71, peu à 73 ou 75.

Toutes les cellules ayant un nombre anormal de chromosomes possèdaient toujours 1 ou 2 chromosomes X médiocentriques suivant qu'elles étaient mâles ou femelles.

3° *Remarques*

En 1953 HSU et POMERAT ont étudié l'aneuploïdie de cultures de poumon de fœtus de Chien. Les fréquences que nous avons trouvées chez le rein de Chien nouveau-né sont comparables avec les chiffres donnés par ces auteurs, 74 % de cellules diploïdes chez nous, 67 % chez eux. Seul l'intervalle de variation est plus étroit chez nous.

Chez les Chiens plus âgés les fréquences que nous avons trouvées autres que celle correspondant à 78 chromosomes diffèrent beaucoup et ne sont pas logiques. Il est normal de s'attendre à trouver une valeur centrale unique, modale, avec un pourcentage élevé et des valeurs allant en diminuant de part et d'autre, sinon également réparties, du moins avec un pourcentage faible.

Le facteur erreur personnelle existe — nous n'avons pas la prétention d'être infaillible — mais il n'est pas le seul. Il existe une deuxième cause d'erreur, la perte de chromosomes au cours des manipulations. Nous l'avons réduite en choisissant justement des mitoses groupées au sein d'une aire cytoplasmique intacte. Ces deux causes d'erreurs devraient être également réparties. Il n'y a pas plus de chances de se tromper quand on en compte 76 que lorsqu'on en compte 80.

D'autre part en cas de fuite de chromosomes il n'y a pas de raisons de trouver plus de nombres pairs que de nombres impairs dans le caryotype de même que de trouver toujours présents les gonosomes.

L'image de cette répartition se reflète dans celle des cellules tétraploïdes dont l'intervalle de variation va de 136 (2 × 68) à 162 (2 × 81) avec un mode discret à 156 (2 × 78).

En 1963 JACOBS et coll. ont étudié l'aneuploïdie chez l'Homme. Elle varie par exemple chez la femme de 3,05 à la naissance à 17,41 % à 70 ans suivant une fonction linéaire. Ces auteurs ont trouvé 4 fois plus de cellules hypodiploïdes que d'hyperdiploïdes, et cela sur un total de plus de 8 000 mitoses étudiées.

Nous pensons que chez le Chien également l'âge joue un rôle important dans le caryotype des cellules somatiques. De toutes façons il existe une importante aneuploïdie parmi ces cellules chez le Chien normal et cela, dans certaines conditions expérimentales. Nous ne pensons pas que cette répartition ait une valeur générale chez le Chien, mais nous estimons qu'elle est valable pour la suite de nos expériences sur le sarcome de Sticker qui ont été faites dans les mêmes conditions.

b) **Sarcome de Sticker**

Comme pour les cellules normales du Chien les résultats concernant la tumeur de Sticker greffée sont résumés dans un tableau et dans des histogrammes. Ces cellules tumorales se comportant comme des cellules normales, dans un second tableau nous avons consigné l'euploïdie de ces cellules.

Nous n'avons indiqué dans nos tableaux que les résultats de 268 mitoses dessinées à la chambre claire, mais à partir de 147 photomicrographies nous avions trouvé des nombres à peu près identiques.

Nous constatons que pour les 4 séries, les histogrammes ont la même allure que ceux des cellules normales, courbe dissymétrique avec nombre modal de 78 et sensiblement même intervalle de variation.

La taille et la forme des chromosomes ne sont pas modifiées (Figures 33 et 34).

Trois cultures proviennent de tumeurs greffées sur des chiens mâles, elles possèdent un seul chromosome médiocentrique X. On ne voit pas d'anomalies dans la distribution de ce chromosome. Une culture provient d'une tumeur greffée chez un Chien femelle, les mitoses possèdent toutes 2 chromosomes médiocentriques X et 4 quand elles sont tétraploïdes. Il est prouvé et nous l'avons vérifié sur nos cultures de rein de Chien femelle que ce chromosome médiocentrique est le chromosome sexuel femelle.

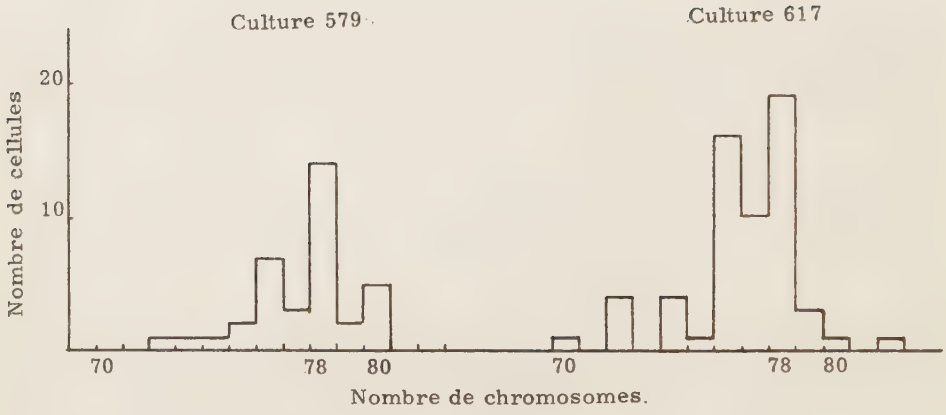
La tumeur qui a donné la culture 617 était portée par un chien femelle (264), elle provenait elle-même d'une tumeur portée par un chien femelle (223).

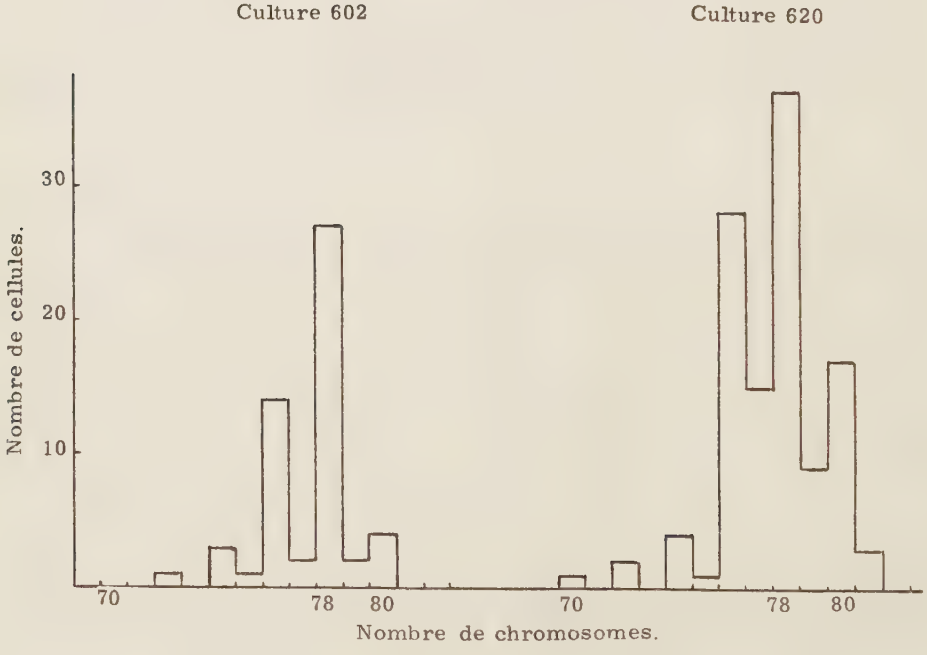
Sexe du chien porteur de la tumeur	N° de l'expérience	Nombre de chromosomes																	Total des cellules	Chromosomes médio-centriques
		53	56	64	66	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82		
M	579				1			1	1	1	2	7	3	14	2	5			35	X
M	602							1		3	1	14	2	27	2	4			54	X
F	617	1	1	1		1		4		4	1	16	10	19	3	1		1	63	XX
M	620					1		2		4	1	28	15	37	9	17	3		116	X

Répartition des chromosomes dans les cellules du sarcome de Sticker cultivées « in vitro »

Ploïdie	578	%	602	%	617	%	620	%	Total	%
N			5	0,29	2	0,12	1	0,08	8	0,16
2N	471	94,20	1658	97,55	1562	97,62	1112	92,66	4803	96,06
3N			1	0,06	1	0,06	2	0,17	4	0,08
4N	25	5,00	35	2,03	33	2,06	77	6,42	170	3,40
6N	3	0,60	1	0,06	2	0,12	5	0,42	11	0,22
8N	1	0,20					3	0,25	4	0,08
Total	500		1700		1600		1200		5000	

Euploïdie dans les cellules du sarcome de Sticker cultivées « in vitro »





Histogrammes de la répartition des chromosomes dans les cultures du sarcome de Sticker.

Les tumeurs qui ont donné les cultures 578 et 602 étaient portées par des chiens mâles 231 et 263, elles provenaient elles-mêmes respectivement des chiens 215 et 223 qui eux étaient des femelles.

La tumeur qui a donné la culture 620 était portée par le chien mâle 260, elle était elle-même le résultat de l'inoculation à ce chien des cellules de la souche 579 à son 6e passage « in vitro ».

Des mitoses possédant un nombre de chromosomes proche du nombre tétraploïde (145 à 158) ont été observées dans les 4 cultures. Chez les tumeurs portées par les chiens mâles elles ont 2 chromosomes X et chez celle portées par le chien femelle elles en ont 4.

La proportion des mitoses polyploïdes ou du moins voisines d'un nombre polyploïde, compte tenu de l'aneuploïdie, est du même ordre de grandeur que celle du Chien normal.

On voit donc en conclusion que nous avons obtenu un résultat très important : une tumeur de Sticker entretenue par greffe tissulaire de Chien à Chien possède d'une part le même caryotype et la même aneuploïdie que des cellules provenant de tissus normaux du Chien cultivées dans les mêmes conditions et d'autre part le sexe chromosomique de l'animal récepteur.

Enfin, il faut noter que le caryotype des cellules de Sticker cultivées sur un nombre faible de passages (10) n'est pas modifié ; or il ne faut pas oublier que c'est cette souche qui au 6e passage, inoculée dans la muqueuse de la verge d'un Chien nous a permis de reproduire une tumeur transmissible.

c) **Souche 503**

L'essentiel de notre étude sur les chromosomes de la souche 503 repose sur des photomicrographies. Dans des stades ultérieurs nous avons fait des dessins à la chambre claire. Le choix des mitoses a été fait sans idée préconçue. Le seul critère qui nous a guidé était l'espacement des chromosomes à l'intérieur d'une zone cytoplasmique franche de façon à lever toute ambiguïté sur le dénombrement ultérieur (Figures 36 et 37).

Ce que l'on remarque en premier lieu, c'est que dans l'ensemble les chromosomes du sarcome de Sticker cultivé longtemps en lignée continue ont une taille plus grande que ceux du Sticker cultivé en première explantation ainsi que ceux des organes du Chien normal. D'autre part dans une cellule tétra- ou polyploïde on trouve souvent de petits chromosomes ne dépassant pas 1μ et que l'on ne trouve pas dans les autres cultures que nous avons faites. Enfin, dans ces mitoses on voit un plus grand nombre de chromosomes métacentriques.

Pour analyser la distribution des chromosomes nous avons groupé les données en classes de 10 en 10.

Dans un premier temps nous avons réuni toutes les données dans un histogramme général de la souche et nous avons constaté que :

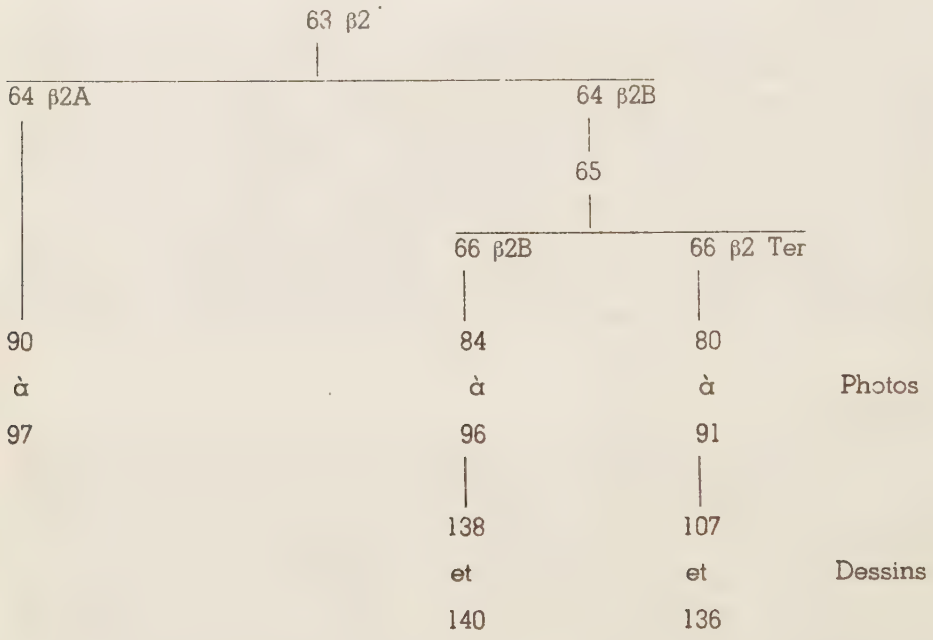
1° Il y avait des mitoses appartenant pratiquement à toutes les classes depuis 10-20 jusqu'au-dessus de 500.

2° Cependant on observait 2 groupements principaux de cellules, l'un de 60 à 80 avec maximum entre 70 et 80 englobant le nombre diploïde et l'autre entre 100 et 160 avec 2 modes, l'un à 120-130, l'autre à 140-150.

Au-delà de 160 les dénombrements des cellules polyploïdes ont été trop peu nombreux pour donner une idée de la courbe de répartition et de ses maxima.

Ayant observé des différences dans les fréquences suivant les lignées nous avons étudié celles-ci séparément.

Nous rappelons que la lignée β provient d'une dichotomie faite dès le 2e passage. En novembre 1962 à la suite d'un accident nous avons perdu toutes nos lignées sauf β2 que nous avons scindée alors en nouvelles sous-lignées.



On voit que l'étude a été faite sur des sous-lignées séparées depuis 20 à 30 passages sur photos, et à la chambre claire sur 138 β2B, 107 et 136 β 2 ter. A notre départ d'Algérie nous n'avons emporté que ces deux dernières sous-lignées.

La lignée β2A a 2 modes 65-75 et 140-150. Elle est hypodiploïde et hypotétraploïde.

La lignée β2B a aussi 2 modes 70-75 et 140-150. On peut considérer ces 2 lignées comme identiques. Les bornes de l'intervalle 140-150 sont doubles de celles de l'intervalle 70-75.

Par contre en ce qui concerne la lignée β 2 ter on constate 2 faits :

1° un mode entre 70 et 80 qui rappelle les cellules de première explantation,

2° un second mode entre 120 et 130.

SOUCHE 503

Nombre de chromosomes	Lignée β A 90e au 97e passage		Lignée β 2 B 84e au 96e passage		Lignée β 2 Ter 80e au 91e passage	
	Nombre de cellules	Nombre moyen de chromosomes méta-centriques	Nombre de cellules	Nombre moyen de chromosomes méta-centriques	Nombre de cellules	Nombre moyen de chromosomes méta-centriques
10-20	5	0,2				
21-30			1	1		
31-40	4	1,7	5	1,5	4	1,7
41-50	3	1,3	3	1,7	1	2
51-60	5	1,8	3	2		
61-65	3	3,8	4	2,5	8	2,4
66-70	25		8			
71-75	25	3,2	15	2,9	15	3,7
76-80	6		6			
81-90	2		5	4,6	8	5
91-100			1	7	7	5,7
101-110	1		2	4	13	8
111-120	3	4,7	6	5,1	41	6,4
121-130	7	5,4	14	6,1	49	6,5
131-140	14	6	23	5,7	27	6,9
141-150	30	6,3	68	6,9	26	8,2
151-160	4		5	7,2	4	7
161-170	1				1	12
171-180					1	7
181-190	1		1		1	10
190-200			1			
201-210	1		1		3	14
211-220			1		3	13
221-230					5	13,2
231-240					2	
241-250	1				6	15,5
251-260			1		4	13,5
261-270					5	16,4
271-280			2		1	
281-290			5	12,5		
291-300	1		1			
301-320					2	
Total	142		181		237	

Lignée β 2B (passages 138 et 140) : répartition des chromosomes

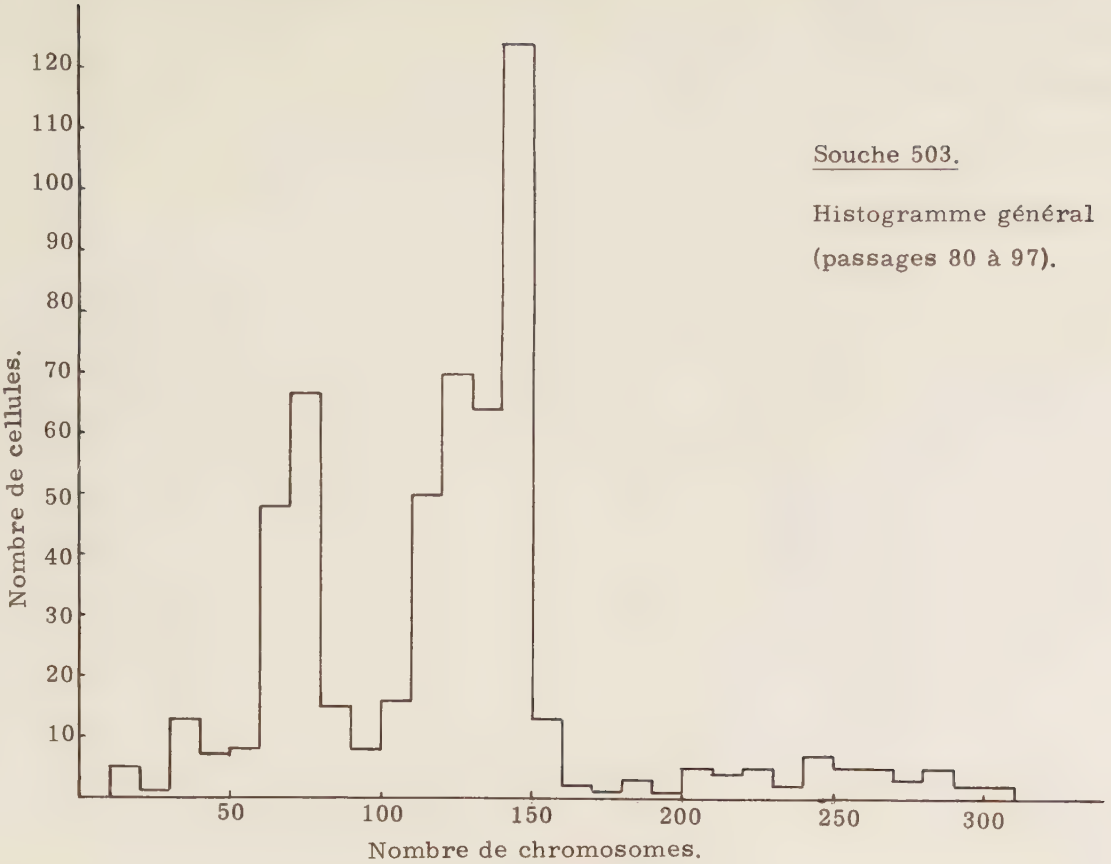
59	96	110	112	114	116	118	120	121 à 127	128	130	132	134	136	138	140
1	2	1		1	3	5	3		1	1	1	8	6	2	4

142	144	146	148	150	152	154	156	158	160	162	164	166	168	170	Nombre de cellules étudiées
	1	1				1		3	4	3	5	3	1		61

Lignée β 2 ter (passages 108 et 136) : répartition des chromosomes

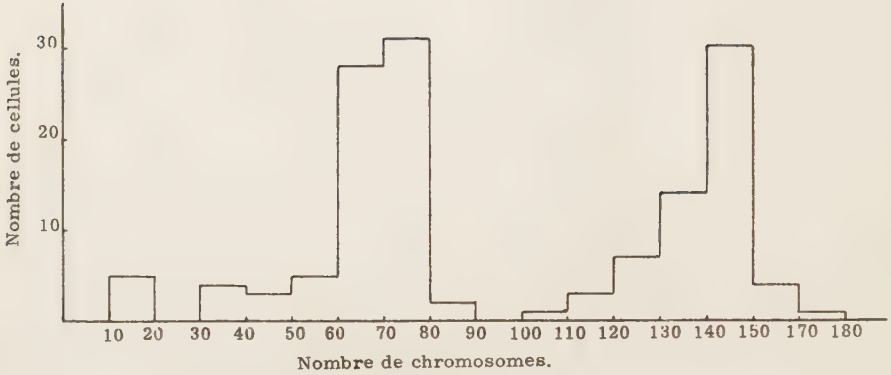
N° des passages	17	18	22	25	27	28	31	35	37	53	54	56	68	78	88	92	100
108	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		2
136																1	

N° des passages	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	132	Nombre cellules étudiées
108	1				3		4		6		2	3	6	1	12		3		2	1	61
136	3		5	1	6	1	6		8		10		3	1	3		1				49

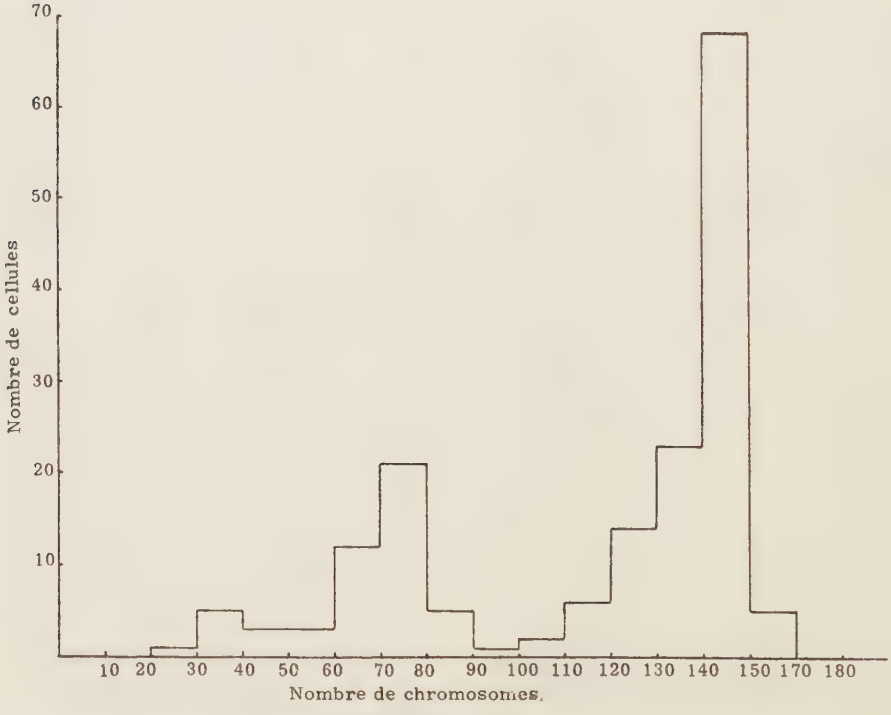


Souche 503.

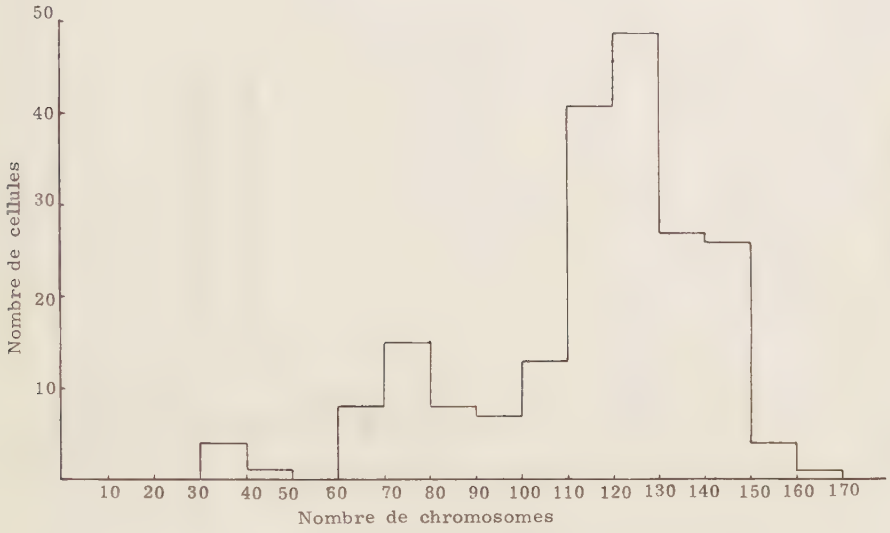
Histogramme général
(passages 80 à 97).



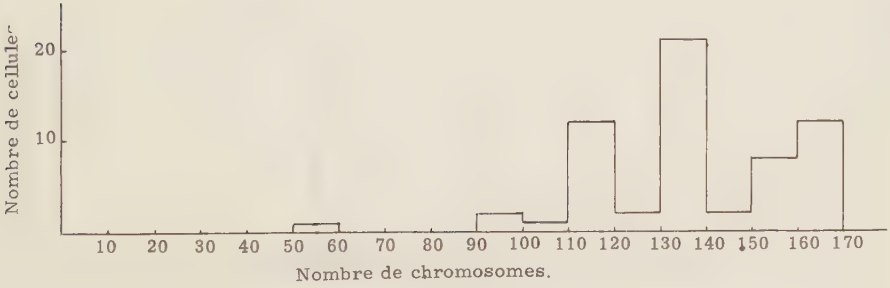
Souche 503. Lignée β 2A (passages 90 à 97)
Répartition des chromosomes.



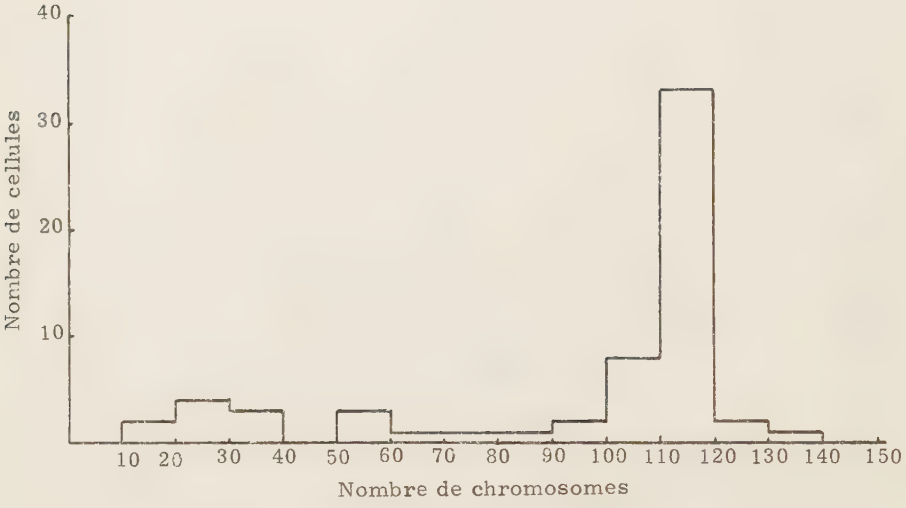
Souche 503. Lignée β 2B (passages 84 à 96)
Répartition des chromosomes.



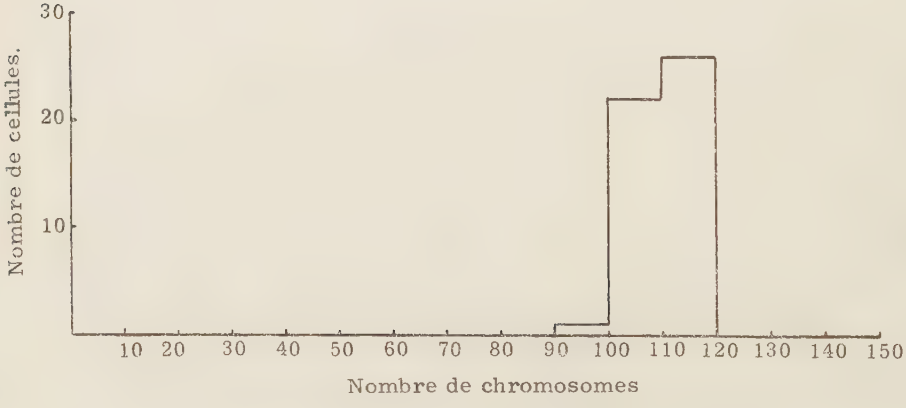
Souche 503. Lignée β 2 ter (passages 80 à 91)
Répartition des chromosomes.



Souche 503. Lignée β 2B (passages 138 et 140)
Répartition des chromosomes.



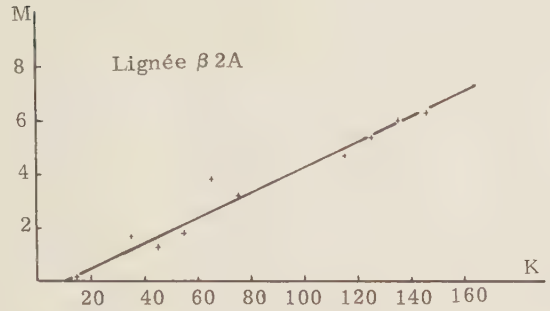
Souche 503. Lignée β 2 ter (passage 108)
Répartition des chromosomes

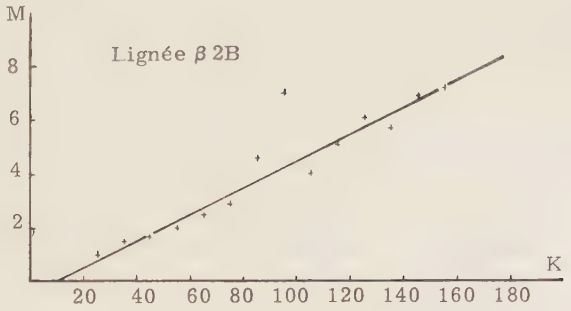


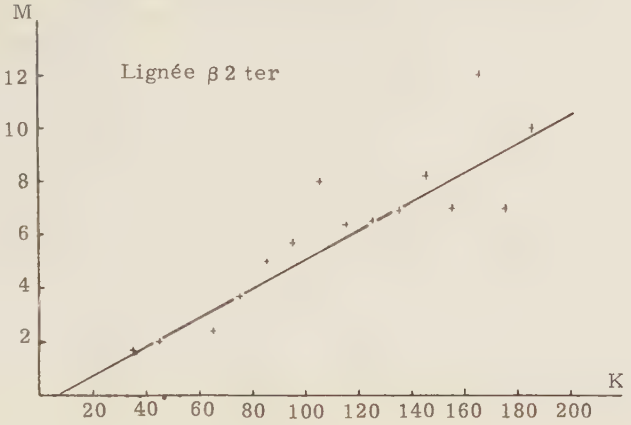
Souche 503. Lignée β 2 ter (passage 136)
Répartition des chromosomes.

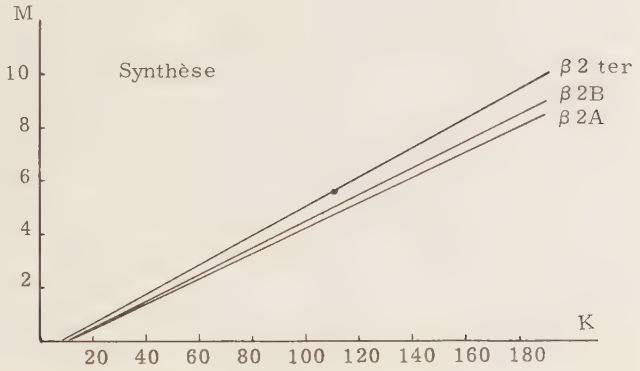
Souche 503

Corrélation entre le nombre moyen de chromosomes médiocentriques (M) et le nombre de chromosomes des cellules (K).









Evolution avec le temps

Notre principale série de mesures a été faite après 20-22 mois de culture « in vitro ». Nous avons fait de nouvelles mesures 4 et 11 mois plus tard. On constate alors pour les 2 lignées que nous avons conservées β2B et β2 ter, la disparition presque complète des cellules ayant un nombre de chromosomes proche de celui des cellules diploïdes ; seules les cellules de β2 ter comptent un petit nombre de mitoses ayant de 50 à 56 chromosomes au 108e passage et n'en comptent plus ensuite.

La lignée β2B oscille entre 90 et 170 chromosomes avec un mode à 130-140. En 10 mois il y a eu disparition des cellules diploïdes et évolution dans le sens hypotétraploïde, pour le groupe principal, triploïde et hypertétraploïde pour les 2 groupes secondaires.

La lignée β2 ter évolue dans le sens d'une diminution du nombre des chromosomes du groupement principal 100-120 avec un mode à 118 qui devient 112-114 six mois plus tard. On peut considérer que cette lignée, compte tenu de l'aneuploïdie, est triploïde.

Corrélation entre le nombre de chromosomes et le nombre de chromosomes médio-centriques

On constate d'autre part que ces cellules de souche même quand elles ont conservé un nombre de chromosomes voisin du nombre diploïde possèdent un nombre plus élevé de chromosomes X médio-centriques, 4, 5 ou 6.

Dans chaque classe nous avons calculé le nombre moyen de chromosomes X. Si l'on porte en abscisse les classes de chromosomes et en ordonnée ce nombre moyen, les points obtenus peuvent être ajustés selon une droite, mais cette droite possède un coefficient angulaire plus élevé que celui que montreraient des cellules normales di-, tétra-, polyploïdes avec 1, 2, n chromosomes X. Sur le même graphique, avec les mêmes unités, alors que des cellules normales mâles auraient un coefficient angulaire de 0,128, les pentes des droites représentant les 3 lignées varient de 0,47 à 0,54.

Pour la lignée β2B il diminue avec le temps et atteint 0,25 au 138e passage.

Pour la lignée β2 ter il atteint 0,7 au passage 108, mais devient nul au passage 136 avec le resserrement de l'intervalle de variation 100-120. Il semble dans ce cas que l'on assiste à la sélection d'une race de cellules triploïdes.

En somme, nous voyons que ces cellules de souche présentent plus facilement des chromosomes X que les cellules normales. Cependant en dehors des cellules hexa- ou octoploïdes nous n'avons jamais atteint les chiffres donnés par MAKINO pour la « stem-line » observée au Japon, 17 métacentriques (médio-centriques) et 42 acrocentriques.

d) **La chromatine sexuelle**

Le corpuscule de Barr se présente comme une petite masse fortement colorée accolée à la membrane nucléaire. Deux formes prédominent : une forme triangulaire, une forme plan-convexe. La taille oscille autour des dimensions de 1 × 1,5 μ.

Parfois on a une forme plan-convexe avec indentation médiane ou bien deux petits bâtonnets simulent un triangle isocèle vide.

Cette chromatine sexuelle a été trouvée avec des pourcentages variables chez les animaux femelles, avec des pourcentages très faibles chez les mâles.

Les résultats sont résumés dans des tableaux.

Cultures témoins

N° expérience	Animal	Organe	Tumeur	Sexe	Chromatine sexuelle %
285	Chien	Rein		F	46
295	—	—		F	35
613	—	—		M	0
618A	—	—		M	1
619	—	—		F	40
337	—	Rate		M	0
540	—	—		M	2
618B	—	—		M	0
283	—	Vagin		F	28
293	—	—		F	29
422	—	—		F	30
428	—	—		F	21
435	—	Clitoris		F	36
439	—	Col		F	22
410	Souris	Mamelle	Epithélioma	F	66
438	Chien	—	—	F	60
418	Femme	Vagin	Sarcome botryoïde	F	21
195	—	Col	Epithélioma « in situ »	F	38

Sarcome de Sticker — Cultures cellulaires

N° de la culture	N° du chien	Sexe	chromatine sexuelle %	Tumeur naturelle	Tumeur greffée	Sexe des 3 donneurs précédents 1 2 3
190	1172	F	32	+		
206	1813	F	33	+		
264	C3	M	0		+	M
306	684	F	32		+	F M M
386	C43	F	36		+	M F F
412	chacal 69	F	39		+	F M M
434	C89	M	2		+	M M F
442	C90	M	0		+	M M F
451	C88	M	2		+	M M F
459	C71	M	1		+	M F M
472	C111	M	0		+	M M M
480	C54	M	2		+	F M F
503	C110	M	0		+	M M M
542	C210	M	1		+	M M M
579	C231	M	0		+	F M M
602	C263	M	0		+	F M F
617	C264	F	42		+	F M F
620	C260	M	1			A partir culture 579 M

1 : Sexe du donneur de la tumeur
2 : Sexe du donneur de la tumeur de 1
3 : Sexe du donneur de la tumeur de 2

Dans des conditions identiques de coloration les chiffres trouvés sont à peu près semblables qu'il s'agisse de tissu normal de Chien ou de tissu tumoral de Chien et en particulier de sarcome de Sticker.

Les chiffres les plus importants que nous ayons trouvés l'ont été chez des carcinomes mammaires de la Souris et de la Chienne (66 à 60 %). Ils sont équivalents à ceux trouvés par ORSI et RITTER chez un carcinome mammaire humain cultivé « in vitro » (62,5 %).

Les chiffres que nous avons trouvés pour le rein de la Chienne sont équivalents à ceux trouvés par BURLINGTON pour le même tissu (40 %).

En ce qui concerne les tumeurs de Sticker greffées chez des femelles nos chiffres vont de 32 à 39 %, soit à peine légèrement inférieurs. Statistiquement cette différence n'est pas significative.

Il y a un fait patent : une tumeur de Sticker greffée chez un Chien ou un Chacal possède la chromatine sexuelle de cet animal, quel qu'ait été le sexe du donneur qui a fourni la tumeur. Six tumeurs de Sticker greffées chez des femelles ou naturelles portées par des femelles et cultivées « in vitro » présentent le corpuscule de Barr dans 30 à 40 % de leurs noyaux (Figure 35). Douze tumeurs de Sticker greffées chez des mâles et mises en culture présentent le corpuscule de Barr dans 0 à 2 % de leurs noyaux. Ce fait corrobore ce que nous avons trouvé dans l'étude du caryotype de ces tumeurs cultivées « in vitro ».

La filiation des tumeurs a été indiquée dans le tableau que nous avons donné dans le chapitre des greffes. Sur 34 passages, 24 l'ont été avec un donneur mâle, 10 avec un donneur femelle, la répartition étant faite au hasard, la proportion est la même que celle des sexes de la population que nous avons utilisée (2 mâles pour 1 femelle).

C. — DISCUSSION

De cette étude des chromosomes et de la chromatine sexuelle du sarcome de Sticker nous pouvons tirer divers enseignements.

1° Le sarcome de Sticker greffé en série et cultivé « in vitro » en première explantation et au moins jusqu'au 10e passage présente le même caryotype que celui des cellules normales du Chien pubère.

Ce fait est en contradiction avec les résultats obtenus par l'Ecole Japonaise. Le travail de MAKINO et de ses collaborateurs ne nous paraît pas contestable. Les cellules qui se sont multipliées « in vitro » par nos soins sont bien des cellules de la tumeur et nous estimons nos chiffres valables.

Nous pensons que ces différences tiennent en ce que les travaux ont été faits dans des localités géographiques très différentes, très éloignées et surtout sur des matériels différents : tumeurs naturelles d'une part, tumeurs greffées de l'autre et que dans ces conditions une maladie n'a pas forcément les mêmes caractéristiques.

2° Ces mêmes tumeurs possèdent un sexe, celui de l'animal porteur de la greffe et non celui de l'animal donneur. L'unique chromosome médiocentrique du Chien joue ainsi le rôle de marqueur.

Récemment J.A. THOMAS, 1964, a trouvé un résultat analogue. Cet auteur a provoqué des tumeurs chez le Hamster par inoculation intrapéritonéale des cellules de la souche BHK 21 (STOCKER et MAC PHERSON, 1961). Cette

souche cellulaire créée à partir du Hamster a un caryotype mâle. Une des tumeurs provoquée chez un Hamster femelle a redonné une nouvelle lignée continue par culture « in vitro » qui a présenté le caryotype femelle, donc le caryotype de l'animal porteur de la tumeur et non celui de la souche initiale BHK 21, inductrice de la tumeur (J. André THOMAS et Col. 1964).

On peut admettre que les cellules inoculées lors de la greffe chez le Chien ne prolifèrent pas elles-mêmes, mais qu'elles hébergent un virus « associé » qui est libéré des cellules et va induire les cellules réticulaires de l'animal.

Le fait avait été soupçonné depuis fort longtemps par BASHFORD, MURRAY et CRAMER en 1905 et par WADE en 1908. De l'examen de biopsies précoces de greffes, ces auteurs arrivaient à conclure que les greffons dégénéraient en tout (pour les premiers) ou en partie (pour le second) et que les cellules conjonctives de l'hôte se transformaient et jouaient un rôle dans la formation de la tumeur.

Nous retrouvons les résultats que nous avons vus plus haut lors de l'inoculation des cultures cellulaires à l'animal, cellules qui disparaissent du point d'inoculation. Mais ici, le fait est plus péremptoire. La signature du sexe permet d'affirmer que les cellules de la tumeur « greffée » ne sont pas les descendantes des cellules inoculées.

3° Les cellules de souche entretenues pendant des mois ou des années ont une constitution chromosomique qui évolue avec le temps, chaque lignée ayant une destinée propre. Mais ce fait est un caractère général des souches de cellules cultivées « in vitro ».

4° En se plaçant sur un point de vue plus général nos résultats se situent dans le cadre des données récentes sur la constitution chromosomique des cancers.

BOVERI le premier en 1914 avait formulé l'hypothèse que la malignité des cellules somatiques des Mammifères pouvait résulter d'une constitution chromosomique aberrante.

Depuis, de nombreux progrès ont été faits dans la technique cytologique. Certains auteurs considèrent la variation génétique au niveau chromosomique comme la cause de la transformation néoplasique ou qu'elle est au moins indispensable pour la croissance des tumeurs (MAKINO 1957 ,HAUSCHKA 1958, LEVAN et BIESELE 1958. TJIO et OSTERGREN 1958, FORD, HAMERTON et MOLE 1958). D'autres considèrent que l'instabilité du caryotype n'est pas essentielle pour l'acquisition des propriétés néoplasiques (SACHS et GAILLILY 1956, OHNO et KINOSITA 1958, NOWELL, HUNGERFORD et BROOKS 1958, KAPLAN 1959).

Récemment BAYREUTHER (1960) a montré que pour un grand nombre de tumeurs primaires spontanées (leucémies humaines, murines, bovines, etc.), des tumeurs provoquées par déséquilibre endocrinien ou par carbures cancérigènes, la plus grande partie des néoplasmes se révélaient avoir une constitution chromosomique et une spécificité sexuelle normale. En particulier il a vérifié le fait pour les leucénies aviaires, le sarcome de Rous, de Fujinami, les leucémies de Gross, de Graffi, de Friend, le polyoma ,les tumeurs mammaires de souris et le fibrome de Shope : 98 % de ces tumeurs sont normales. Pour cet auteur il semble improbable que les virus oncogènes causent une transformation néoplasique par une mutation chromosomique.

En 1963, MAC MICHAEL et col. ont montré que le papillome du lapin

provoqué par le virus de Shope et les carcinomes qui en dérivent conservent le nombre diploïde de chromosomes.

Nous avons provoqué une tumeur de Sticker retransmissible par l'inoculation d'une souche cellulaire à son 6e passage qui ne présentait pas d'altérations chromosomiques. Par contre les cellules de la souche 503 après un an de culture « in vitro » n'ont donné que les premiers stades de la formation des polypes et 2 cas seulement de polypes typiques alors qu'elles ont été inoculées sur un nombre de chiens 10 fois plus grand. Il y a eu donc amoindrissement du pouvoir pathogène avec le temps tandis que cette souche a montré l'apparition de caractères anarchiques dans sa constitution chromosomique.

Nous pensons apporter un argument de plus à la seconde conception. Les types chromosomiques anormaux qui apparaissent dans la majorité des tumeurs très avancées ou des lignées cellulaires âgées sont d'importance secondaire dans l'acquisition des propriétés malignes.

CHAPITRE IV

ESSAIS SUR LA TRANSMISSION A-CELLULAIRE DU SARCOME DE STICKER

A. — ESSAIS SUR LA TRANSMISSION A-CELLULAIRE DU SARCOME DE STICKER PAR FILTRATS OU SURNAGEANTS

I. — TRAVAUX ANTERIEURS

Le caractère de contagiosité du sarcome vénérien du Chien a depuis longtemps fait suspecter l'origine infectieuse de la maladie. STICKER en 1905, puis WADE en 1908 firent des recherches bactériologiques pour lui trouver un agent microbien. Aucun germe ne put être isolé sauf des germes occasionnels que les auteurs ont reconnu être des contaminations.

Devant ces échecs on pensa alors à un ultra-virus.

STICKER le premier a étudié la résistance mécanique des cellules de cette tumeur. Ni le broyat des cellules, ni le filtrat, ni le surnageant de la centrifugation n'ont reproduit de tumeur entre ses mains. Etudiant la résistance chimique il a montré que la glycérine n'a pas d'action nocive, puisqu'il a réussi une greffe avec du matériel tumoral glycériné.

WADE a broyé des tumeurs, les a filtrées. Le liquide obtenu injecté sous la peau des chiens, aucun n'a développé de tumeur.

MATSUBA et HIROYE en 1927 inoculèrent des filtrats de tumeurs spontanées dans le testicule de chiens sans résultats.

En 1934 STUBBS et FURTH inoculèrent des chiens avec du matériel gardé dans le glycérol à 50 % de 10 jours à 4 mois ou desséché sur de l'anhydride phosphorique. Ils n'obtinrent pas de résultats. Le tissu tumoral fut broyé, centrifugé et filtré. Les filtrats furent inoculés sans succès. Le surnageant de centrifugation non filtré donna des tumeurs. Or le matériel tumoral contenait beaucoup de graisse qui pouvait avoir entraîné des cellules. Cette expérience fut répétée avec un résultat négatif.

La même année DE MONBREUN et GOODPASTURE utilisèrent l'ascite développée après inoculation intrapéritonéale. Cette ascite fut centrifugée, le surnageant enlevé et remplacé par de l'eau distillée, le tout placé à 5° C pendant 15 minutes, puis le milieu fut rendu isotonique par addition de ClNa sec. La centrifugation du matériel donna trois couches, une couche cellu-

laire, une couche intermédiaire, une couche supérieure lipidique. Chacune fut inoculée séparément, aucune ne donna de tumeur.

AJELLO en 1936 a étudié un chien « à forme extra-génitale de sarcome de Sticker » porteur de nombreux nodules cutanés. Le filtrat des nodules a été négatif.

En 1960 DOZZA et TORLONE ont étudié le problème de la transmission de la tumeur de Sticker en utilisant la technique de la trypsination du matériel tumoral et celle du fractionnement cellulaire. Les cellules trypsinées inoculées sous la peau et dans l'œil ont reproduit la tumeur. Ces mêmes cellules ont été homogénéisées dans l'appareil de Potter en solution de saccharose puis centrifugées à 600 g pendant 10 minutes. Les fractions nucléaires, cytoplasmiques où le mélange des deux ont été inoculés sous la peau ou dans la chambre antérieure de l'œil de 14 chiens. 12 ont développé des tumeurs mais avec des temps de latence plus importants que dans le cas des cellules fraîches. Les auteurs reconnaissaient qu'il y avait environ 2,5 pour 1 000 de cellules encore vivantes dans leur broyat.

En 1951 LASSERRE, PUGET, VALLEE et BORREL firent la première tentative d'isolement d'un virus du sarcome de Sticker par inoculation à l'œuf embryonné de matériel prélevé sur des chiens porteurs de tumeurs naturelles. Dans trois séries d'expériences les filtrats de tumeurs leur permirent de faire de nombreux passages en série avec une mortalité des embryons parfois importante, les embryons présentant des lésions congestives hémorragiques. Ils conclurent à l'existence d'un virus mais ne purent reproduire la maladie chez le Chien.

II. — **TRAVAUX PERSONNELS**

Afin de vérifier l'hypothèse de l'étiologie virale du sarcome de Sticker, nous avons, entre autres expériences, cherché à mettre en évidence un agent particulaire à partir du broyage mécanique des cellules.

1. MATERIEL ET METHODE

Le matériel provient soit de tumeurs spontanées, soit de tumeurs greffées chez le Chien ou le Chacal, fraîchement prélevées ou conservées au congélateur à — 27 °C.

Au début nous avons broyé des fragments de tumeurs dans un mortier avec du sable stérile, puis très vite nous avons utilisé le microbroyeur de Durrel et Sausse. Le matériel cellulaire désintégré était mis en suspension en général dans 10 fois son volume de liquide de Hanks et centrifugé de 3 à 5 000 tours/minute, le surnageant était employé tel que ou filtré sur Seitz EK.

Nous avons inoculé des souris, des œufs, des cultures cellulaires ou des chiots.

a) **Inoculation des Souris.**

1) E 207. — On inocule par voie intracérébrale 15 souris âgées de 5 mois avec le milieu d'une culture « in vitro » de sarcome de Sticker naturel faite 15 jours avant. Le milieu était centrifugé. Chaque animal a reçu 1/10 de ml de surnageant.

2) E 313. — On inocule dans le péritoine 16 souriceaux de 1 jour (1/10 de ml) et 12 souriceaux de 3 semaines (1/5 de ml) avec le surnageant de la centrifugation du broyat d'une tumeur greffée chez le Chacal et prélevée la veille.

b) Inoculation dans l'œuf de poule embryonné

De 1959 à 1961 nous avons fait 63 tentatives pour reproduire les expériences du groupe LASSERRE.

Nous nous sommes servi d'œufs de race pure New-Hampshire provenant d'un élevage sélectionné de la région algéroise. Les œufs ont été inoculés soit dans la membrane chorio-allantoïdienne, soit dans le vitellus et incubés soit à 38° C, soit à 35° C. Tous les prélèvements ont été testés au point de vue bactériologique.

Nous avons inoculé des broyats de tumeurs naturelles, de tumeurs greffées sur le Chien ou le Chacal, congelées ou non, mis en suspension dans le sérum physiologique, le liquide de Hanks, l'eau distillée, le tampon de Clark à pH 6, filtrés ou non. Nous avons inoculé également des cellules trypsinées, des cellules en culture « in vitro », le milieu nutritif de ces cellules.

c) Inoculation des cultures cellulaires

Nous avons utilisé des tubes à lamelle ensemencés avec des souches de lignée continue HeLa et KB et des cellules de première explantation : rein de Lapin, embryon de Poulet et rate du Chien.

Cellules HeLa et KB ont été inoculées les unes avec le broyat d'une tumeur greffée chez un chien, centrifugé et congelé 10 jours, les autres avec celui d'une tumeur greffée chez le Chacal mais filtré sur Seitz EK.

Les cellules de rein de Lapin ont été inoculées avec le broyat centrifugé d'une ovoculture (embryon et membrane chorio-allantoïdienne), elle-même deuxième passage d'une ovoculture faite avec le broyat centrifugé à 6.000 t/m d'une tumeur greffée chez le Chien.

Les cellules d'embryon de Poulet ont été inoculées avec le broyat filtré d'une ovoculture, elle-même obtenue à partir d'œufs inoculés avec le broyat filtré d'une tumeur de Sticker naturelle.

Cas de la rate du Chien. — (E 337). Nous avons adapté une méthode de culture dérivée de celle employée par MAUPIN pour la séparation des leucocytes.

Nous avons fait l'exérèse de la rate chez un chien. Une partie est trypsinée selon la méthode classique. A l'issue du dernier lavage les cellules sont remises en suspension et on leur ajoute un volume égal de solution commerciale à 3,5 % de polyvinylpyrrolidone (Subtosan). Le tube contenant la suspension est incliné à 45° sur un support et mis à l'étuve pendant une heure. Il y a sédimentation en plusieurs couches, l'intermédiaire contenant la majorité des hématies. On prélève la couche inférieure formée de petits groupes cellulaires et la supérieure formée de cellules spléniques. Après centrifugation et rejet du surnageant le culot est remis en suspension et on laisse 30 minutes à l'étuve. Il se produit alors la sédimentation paradoxale décrite par MAUPIN : les cellules spléniques et les menus fragments

tombent au fond, les hématies restent en suspension. On cultive ensuite les cellules en milieu à la caséine additionné de 12 % de sérum de Cheval et de 2 % d'extrait embryonnaire. On ensemence des tubes à lamelle et des flacons.

Le 7e jour le tapis cellulaire sera inoculé avec le surnageant filtré d'un broyat de tumeur greffée chez le Chien, prélevée 14 jours auparavant et congelée à — 27 °C.

Quatre jours après, 2 flacons de Roux seront trypsinés et les cellules remises en suspension dans 1 ml de liquide de Hanks seront inoculées sous la peau du Chien donneur de la rate.

d) **Inoculation au Chien**

Les expériences sont résumées dans un tableau.

2. RESULTATS

a) **Inoculations à la souris**

Nos expériences ont été négatives.

b) **Inoculations à l'œuf embryonné.**

Les résultats ont été décevants. Dans un certain nombre d'essais nous avons obtenu une certaine proportion d'œufs inoculés morts en 1 à 3 jours avec des lésions hémorragiques. Nous avons fait alors une ou deux subcultures, mais à partir du second passage il n'y avait plus de mortalité. Les témoins morts n'étaient jamais hémorragiques, mais du fait d'une certaine mortalité parmi eux, les différences entre œufs témoins et œufs inoculés n'étaient pas toujours significatives. Il nous a été impossible de tirer de conclusions positives de ces expériences.

c) **Inoculations aux cultures cellulaires**

Les inoculations aux cellules de souche HeLa et KB, aux cellules de rein de lapin et d'embryon de poulet n'ont pas révélé de lésions cytopathogènes.

Cas des cellules de la rate. Les cellules ayant poussé en tubes à lamelle et inoculées n'ont pas présenté de lésions cytopathogènes et en particulier pas de corps d'inclusion.

Le chien inoculé avec les cellules de sa propre rate, cellules histiocytaires de morphologie proche de celles du sarcome de Sticker en culture « in vitro », a présenté un petit nodule au point d'inoculation trois semaines après, nodule qui a atteint 1,5 × 1 cm le deuxième mois au moment de l'exérèse.

L'image histologique de cette masse tumorale était celle d'un **réticulosarcome** (Figure 38).

Sur le moment nous n'avons pas attaché l'importance qu'il fallait à ce résultat, obnubilé par d'autres recherches et nous n'avons pas poursuivi ces travaux.

d) **Inoculation au chiot**

Certains chiots sont morts en 15 jours, d'autres ont dépassé un an après l'inoculation, la plupart ont vécu de 4 à 6 mois.

N°	Tumeur naturelle	Tumeur greffée	Vol. de tumeur utilisé	Surnageant	Filtrat	Glycérol	Durée de la congélation	Nombre de chiots	Age des chiots	Observations
1		Chien A1 N° 3	2 ml	3500 t/m 15 mn			1 nuit à — 80° C	3	4 jours	
2		» A1 N° 2	1 ml	3000 puis 4000 t/m 20 mn				mêmes animaux	34 jours	
3		» A3 N° 1	1 ml	3000 t/m	Seitz EK		10 jours à — 30° C	4	30 heures	
4							12 jours à — 30° C	2	12 heures	Même filtrat que 3
5		» B2 N° 6	4 ml	4000 t/m 10 mn		50 %	65 jours à — 30° C	3	30 heures	
6							66 jours à — 30° C	3	20 heures	Même surnageant que 5, mais sans glycérol
7 a b		» A5	5 ml	3000 t/m 25 mn	Seitz EK	30 %	63 jours à — 30° C	a) 2 b) 5	24 heures	a) Surnageant non filtré b) Filtrat
8		» 68	15 ml	3000 t/m 10 mn	Seitz EKS + Kieselgühr		5 jours à — 30° C	3	12 heures	Surnageant dilué en eau et en sérum physiol
9		» 89	40 ml	3000 t/m 15 mn			Tumeur 7 jours à — 30° C	mêmes animaux	78 jours	Broyat en tampon de Clark, pH 6
10	1918 PC rechute à distance après RX		10 ml	4500 t/m	Büchner fin		Tumeur 55 jours	6	24 heures	
11		» 111	10 ml	4500 t/m			Glacière 14 jours	4	6 heures	

Très souvent les ganglions inguinaux superficiels ont présenté une hypertrophie pendant une dizaine de jours après l'inoculation, puis tout est rentré dans l'ordre.

Aucun chiot n'a développé de tumeurs.

3) DISCUSSION

Nous avons été surpris de voir que les auteurs anciens qui ont inoculé au Chien des filtrats de la tumeur de Sticker n'ont utilisé qu'un nombre très faible d'animaux (STICKER : 4 chiens, STUBBS et FURTH : 2 chiens).

On a établi comme un dogme que le sarcome de Sticker ne pouvait être transmis par filtrat, mais seulement par greffe de cellules et l'on a admis longtemps que lors du coït qui est prolongé chez le Chien, des tumeurs friables se détachent des cellules qui se greffent sur la muqueuse congestionnée de l'antagoniste.

Nous n'avons utilisé que 35 chiots neufs ; ce nombre d'animaux est important par rapport aux auteurs qui nous ont précédé, il est très faible quand on considère le nombre de souris utilisées dans les recherches sur les virus oncogènes.

D'autre part les auteurs anciens ont tous employé des animaux adultes. Nous n'avons inoculé que des animaux très jeunes, nés parfois depuis quelques heures.

Il est difficile de se procurer des animaux âgés de moins de 24 heures. Nous avons eu recours à des amis qui nous prévenaient quand leur chienne avait mis bas. Il était difficile souvent d'opérer un chien sans le sacrifier, broyer la tumeur, la filtrer et aller inoculer des chiots nés déjà depuis 20 heures. Nous avons pensé remédier à cet inconvénient en constituant des stocks de filtrat ou de surnageant congelés avec ou sans glycérol.

Nous pensons trouver la raison de nos échecs dans cette façon d'opérer. Le seul cas positif que nous ayons observé a eu lieu quand dans la même journée nous avons fait le broyat de la tumeur congelée, la filtration et l'inoculation sur des cellules de la rate cultivées « in vitro » puis réimplantées chez l'animal donneur, animal d'ailleurs qui n'était pas un nouveau-né mais avait 6 mois. Nous pensons qu'il y a eu là induction des cellules normales de la rate et « a posteriori » nous regrettons de ne pas avoir davantage utilisé cette méthode.

B. — ACIDES NUCLEIQUES DU SARCOME DE STICKER

A côté des essais de transmission par filtrats ou par surnageants de centrifugation de broyats tissulaires, nous avons essayé de savoir s'il était possible d'extraire un acide nucléique infectieux de cette tumeur.

I. — TRAVAUX ANTERIEURS

A notre connaissance, à ce jour, un seul auteur a fait une tentative dans ce sens.

THIERY en 1950 a étudié le pouvoir cancérigène des thymonucléines extraites du sarcome de Sticker. Une tumeur après broyage au sable est mise en contact 4 heures avec du ClNa M. Le tout est centrifugé ensuite deux fois à 6 000 tours/minute, 30 minutes .Il inocule sous la peau de 2 chiots âgés de 2 mois, 5 ml de surnageant. De plus à partir de 10 ml de surnageant, il précipite les nucléoprotéines à l'état filamenteux ; elles sont injectées sous la peau d'un troisième chiot du même âge. Dans les 3 cas il obtient le 2e mois des nodules qui atteindront la taille d'une noisette à la fin du 3e mois. A ce moment une biopsie provoque l'arrêt de la croissance, puis la diminution du volume des tumeurs et leur disparition. Au point de vue histologique, il s'agissait dans les 3 cas d'histiocytome typique. Les animaux devinrent par la suite, réfractaires à une greffe ultérieure de tumeur de Sticker. L'auteur ajoute que les TNP extraites de sarcome de Sticker de malignité atténuée (c'est-à-dire ne donnant pas de métastases) ne provoquent pas d'histiocytome.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

1° MATERIEL ET METHODE

Les tumeurs que nous avons employées proviennent de notre souche A. Nous n'avons pas utilisé de tumeur spontanée, faute de chiens disponibles. l'extraction a été faite soit dès après l'exérèse, soit sur du matériel congelé à — 27 °C, prélevé au maximum deux mois auparavant.

Extraction des nucléoprotéines

Dans une expérience nous avons extrait les désoxyribonucléoprotéines selon MIRSKY et POLLISTER (1946) à partir de 15 g d'une tumeur prélevée et congelée depuis un mois.

Extraction de l'acide ribonucléique

Nous avons employé la méthode au phénol de SCHUSTER, SCHRAMM et ZILLIG (1956) dans 13 expériences.

Après action du phénol et centrifugation la couche supérieure opalescente a été prélevée et précipitée 3 fois à l'alcool froid. A l'issue de la dernière précipitation et après remise en suspension on a prélevé une partie aliquote (1/5) que l'on a précipitée, puis séchée et pesée. La proportion de RNA extrait a varié de 1/500 à 1/1 000 du poids de la tumeur.

Extraction de l'acide désoxyribonucléique

Nous avons utilisé deux méthodes : la méthode au chloroforme de SEVAG, LACKMAN et SMOLLENS (1938) dans 5 expériences et la méthode de déprotéinisation au laurylsulfate de MARKO et BUTTLER (1951) dans 4 expériences.

Dans les deux cas à l'issue de la dernière opération le précipité a été séché et pesé. Il correspondait à 1/300 - 1/500 du poids de la tumeur.

Le poids de la tumeur utilisée dans les extractions des deux acides a varié de 10 à 42 grammes.

Dans tous les cas nous avons travaillé dans des bains de glace ou avec des solutions et des récipients refroidis. Comme nous ne possédions pas

de centrifugeuse réfrigérée, les godets étaient refroidis à — 20 °C ainsi que les pots à centrifuger avant d'être mis dans la centrifugeuse dont le couvercle était ouvert pour éviter un trop grand échauffement. Bien qu'à l'extérieur la température fut méditerranéenne, nous avons fait plusieurs mesures de la température dans les pots en fin de centrifugation, elle ne dépassait jamais 5°C.

Contrôle des préparations

Lors de la mise en solution de nos produits nous avons fait deux sortes de réactions de contrôle : d'une part pour voir si la déprotéinisation avait été bien conduite — réaction de Millon, réaction xanthoprotéique, réaction du biuret — d'autre part pour voir si les produits finaux correspondaient bien à des acides nucléiques, réaction de Bial pour le pentose, réaction de Dische pour le désoxyribose.

Les réactions des protéines ont toujours été négatives et les réactions des sucres positives. Nous n'avons pas eu coexistence des 2 sucres.

Expériences

Notre expérimentation a été conduite sous 3 angles différents : inoculation d'acides nucléiques à des cultures cellulaires, à des souris et à des chiens.

a) **Cultures cellulaires.**

Rein.

E. 295. Nous avons fait l'exérèse d'un rein chez une chienne et après trypsination nous avons ensemencé des tubes de Leighton et des flacons de Roux. Cinq jours après un tapis cellulaire s'étant développé. nous avons inoculé les cultures, d'une part avec une solution de ribonucléoprotéines, d'autre part avec une solution de désoxyribonucléoprotéines dans le ClNa M.

3 jours après nous avons trypsiné 2 flacons inoculés avec la RNP, les cellules récoltées après centrifugation ont été inoculées à la base de la vulve de la femelle qui a fourni le rein.

KB.

E 487. Nous avons inoculé une solution de RNA à des tubes de la souche KB que nous entretenions dans notre laboratoire.

b) **Souris et souriceaux.**

E 298. Nous avons inoculé une solution de DNP faite 2 jours avant et congelée à des souris âgées de 3 jours (7), 10 jours (7) et 30 jours (9).

Par la suite nous avons utilisé uniquement des souriceaux de 1 ou 2 jours.

Les expériences sont résumées dans le tableau suivant :

1. **Acide désoxyribonucléique**

N° de l'expérience	Date	Age des souris	Nombre	Voie sous-cutanée	Voie intra-péritonéale	Observations
526 B	29.12.1961	1 jour	58	23	35	Tumeur congelée 25 jours

2. **Acide ribonucléique**

N° de l'expérience	Date	Age des souris	Nombre	Voie sous-cutanée	Voie intra-péritonéale	Observations
483	28. 4.1961	4 jours	4	4		Tumeur fraîche
485	3. 5.1961	1 jour	8	8		ARN précédent congelé 5 jours
512	21. 8.1961	1 jour	25	13	12	ARN congelé 14 jours
526	26.12.1961	1 jour 2 jours	70 19	33 9	37 10	Tumeur congelée 25 jours
			126	67	59	

c) **Inoculation au Chien.**

1) E 297, 29-7-1959.

Nous avons cherché à reproduire l'expérience de Thiery. A partir d'une solution de DNP nous avons inoculé 2 chiots avec la solution brute et 2 chiens après précipitation à l'eau distillée et redissolution dans le ClNa M. Les chiots étaient âgés de 1 mois. Chacun a reçu l'équivalent en matériel nucléaire de 1 ml de tumeur.

2) E 481, 21-4-1961.

Exérèse le jour même d'une tumeur greffée chez le chien 54 (passage 6A). Dix gr sont traités par la méthode au phénol. Le lendemain le RNA congelé est inoculé à 8 chiots nés le 21 âgés de moins de 30 heures. La dose inoculée représente 1 ml de tumeur fraîche.

3) E 482, 24-4-1961.

La veille nous avons extrait le RNA de 37 g de tumeur congelée depuis 29 jours. La solution de RNA décongelée est inoculée à 9 chiens âgés de 48 heures. La dose inoculée correspond à 2 g de tumeur.

4) E 483.

Cette expérience sera vue en détail plus loin.

5) E 500, 7-7-1961.

La veille nous avons procédé à l'extraction de l'ARN de 30 g de tumeur congelée depuis 7 jours (chien 121 passage A 10). L'inoculation est faite sur 2 chiens adultes et 2 autres âgés de 6 mois.

6) E 501, 9-7-1961.

En même temps que nous faisions l'extraction de l'ARN dans l'expérience précédente nous avons extrait l'ADN. La solution de DNP est restée 1 jour à la glacière avant l'extraction par le chloroforme. La totalité est inoculée à 4 chiots de 5 mois (20 mg par animal).

7) E 509, 8-8-1961.

Cinq chiots âgés de 6 semaines reçoivent l'ARN extrait par la méthode au phénol de 20 g de la tumeur du chien 121 congelée depuis 11 jours (5 mg par chiot).

8) E 510.

On inocule 5 chiots âgés de 2 mois avec l'ADN extrait par la méthode de Sevag de 25 g de la même tumeur (10 mg par animal).

9) E 517.

A. — Le 7-9-1961 nous faisons l'extraction de l'ARN par la méthode au phénol de 40 g de la tumeur du chien 134 inoculé dans le péritoine et sacrifié le 25-8, tumeur congelée immédiatement.

On inocule 6 chiens adultes.

B. — Le lendemain l'ADN est extrait par la méthode de Sevag de la solution de DNP de la tumeur précédente. On inocule 6 chiens adultes (10 mg par animal).

10) E 526, 26-12-1961.

Nous avons extrait l'ARN de 23 g de la tumeur du chien 163 (11e passage) congelée depuis 25 jours. La moitié est inoculée à 5 chiots âgés de moins de 24 heures (4 mg par animal).

Les animaux ont été inoculés dans le derme de la peau de l'abdomen.

Tableau récapitulatif

	DNP	DNA	RNA
Chiots de 1 jour			22
Jeunes impubères	4	9	10
Adultes		6	8
Total	4	15	40

2° RESULTATS

a) Cultures cellulaires

Les cellules de rein de Chien inoculées avec des RNP ou des DNP n'ont pas montré de lésions cytopathogènes particulières. Le chien donneur du rein à qui on a injecté ces mêmes cellules n'a pas développé de tumeur.

Avec les cellules de la souche KB les résultats ont été négatifs.

b) Souris et souriceaux

Des souris ont été gardées un an en observation. Nous n'avons pas constaté de tumeur.

c) Inoculation au chien

Parmi toutes les séries de chiens que nous avons inoculés une seule nous a donné un résultat net.

Il s'agit de l'expérience E 483 faite le 28-4-1961. Nous avons procédé à l'exérèse d'une tumeur sous-cutanée chez le chien 107 greffée le 28-12-1960 dans la souche D ayant pour origine des métastases cutanées de la souche A.

Nous avons fait l'extraction de l'acide ribonucléique par la méthode au phénol et avons injecté à 3 chiens âgés de 6 mois l'ARN isolé (8 mg par animal).

Toutes les opérations ont été faites dans la même journée.

Chez un des chiens d'expérience, l'inoculation a été positive.

Vers le 20e jour apparaît au point d'injection un petit nodule du volume d'un grain de blé. Ce nodule va croître lentement. Le chien qui avait l'aspect maladif meurt le 30-6, soit 2 mois après. Quelques heures avant sa mort nous pratiquons l'ablation de la tumeur. A l'autopsie nous avons vu un foie congestionné, mais rien à signaler au point de vue tumoral.

La tumeur mesurait 3 × 2 × 1 cm de forme oblongue, sa section était de teinte rosée, elle était friable sous le couteau. L'examen histologique a révélé un **réticulo-histiocyto-sarcome** (Figures 39 et 40).

La tumeur précédente une fois prélevée et l'examen extemporané effectué qui nous confirme le diagnostic que nous pressentions, servira à inoculer d'autres chiens. Trois ml sont broyés, mis en suspension dans le liquide de Hanks et inoculés à 4 chiots âgés de 1 mois.

A partir du 15e jour nous verrons se développer des nodules tumoraux qui à la fin du second mois vont atteindre un volume moyen de 3 × 2 × 2 cm. Vers la 6e semaine nous avons fait une ponction-biopsie qui nous a confirmé la cytologie de la tumeur, cytologie classique de la tumeur de Sticker. Malheureusement nous avons abandonné notre laboratoire pour une période de congé et à notre retour nous ne retrouverons que de petits nodules de 2 à 3 mm que nous avons jugé trop petits pour être greffés.

Certains chiots inoculés avec l'acide ribonucléique sous la peau de l'aine ont montré une dizaine de jours après une hypertrophie des ganglions inguinaux superficiels surtout marquée chez les femelles. En 15 jours tout est rentré dans l'ordre. Nous n'avons pas fait d'examen histologique.

En fait, nous avons inoculé 4 chiens avec des désoxyribonucléoprotéines 15 avec l'ADN isolé par la technique de Sevag et 40 avec l'ARN extrait par la méthode au phénol. Seule l'injection de l'ARN a donné un résultat.

3° DISCUSSION

Dès 1959 quelques mois après avoir établi notre souche A, nous avons fait un essai de transmission des DNP au chiot. Le résultat a été négatif.

Nous avons été amené à l'idée d'extraire l'ARN de ces tumeurs d'une part par les granulations Feulgen-négatives qui se trouvaient dans nos cultures cellulaires, d'autre part en faisant un rapprochement avec les leucémies animales dont le virus est à acide ribonucléique. C'est pourquoi nous avons fait toute une série d'extractions au phénol.

A partir du moment où nous avons obtenu un résultat, nous avons voulu comparer la valeur des deux acides et fait des extractions doubles.

Nous avons dû arrêter nos expériences en fin 1961, la capture des chiens étant devenu difficile du fait des événements révolutionnaires d'Algérie et les quelques chiens dont nous disposions étant réservés à l'entretien de la souche de tumeurs greffées.

Il est indiscutable que l'inoculation d'un RNA extrait du sarcome de

Sticker greffé (7e passage depuis la tumeur naturelle d'origine) nous a permis de provoquer une tumeur du même type histiologique chez un chien dans une série de 3, elle-même transmise par greffe cette fois à 4 chiots tous positifs. L'extraction a été conduite en quelques heures depuis l'exérèse faite le matin jusqu'à l'inoculation au chien l'après-midi.

Dans de nombreux cas notre matériel tumoral est resté congelé en masse à — 27 °C/— 30 C pendant un certain temps. Or dans les laboratoires spécialisés la règle est de congeler sur glace carbonique à — 80 °C.

D'autre part le RNA se dégrade vite. Nous n'avions à notre disposition ni chambre froide, ni centrifugeuse réfrigérée et nous travaillions en Afrique du Nord. Malgré toutes les précautions que nous avons prises pour avoir des instruments refroidis, il est incontestable qu'une grande quantité d'acide a été dégradée. C'est la raison pour laquelle nous faisions l'extraction sur au moins 10 grammes de tissus pour une petite série d'animaux.

D'autre part, il faut remarquer que la tumeur obtenue avec le RNA a été provoquée par un RNA extrait d'une greffe de la souche D elle-même issue de métastases cutanées de la souche A. Il est curieux de constater que 4 chiots greffés avec cette tumeur induite ont développé rapidement des tumeurs, mais qu'à partir d'un certain stade celles-ci ont régressé rapidement et suivant une marche parallèle. Nous avons montré plus haut que dans nos lignées de tumeurs greffées une tumeur régressait parfois, nous n'avons jamais constaté la régression d'une série entière de 3 ou 4 chiens.

En 1962 AJELLO et GIMBO ont étudié l'influence de la ribonucléase sur la transmissibilité de la tumeur de Sticker par greffe cellulaire. Cette greffe est empêché ou retardée par l'enzyme.

Nous n'avons pas fait de test à la ribonucléase pour vérifier si notre acide avait été contaminé par des traces d'ADN. Cependant, il nous semble que l'ADN étant plus stable que l'ARN, si un ADN transformant existait dans ce type de tumeur nous aurions dû obtenir des résultats étant donnés les doses inoculées et le fait que la durée de congélation des tumeurs ne dépassait pas 8 jours dans les cas d'extraction d'ADN.

Nous ne savons pas si notre ARN a été contaminé par des particules virales. Toujours est-il que la tumeur de Sticker peut être transmise en l'absence de cellules vivantes. Nous pensons que c'est là le fait important.

CHAPITRE V

ETUDE DES SARCOMES APPARENTES AU SARCOME DE STICKER

A. — LE RETICULO-SARCOME CUTANE DU CHIEN

Nous voudrions attirer l'attention dans ce chapitre sur une tumeur du Chien, le **réticulo-sarcome de la peau,** tumeur qui présente une grande parenté histopathologique avec le sarcome de Sticker au point que certains auteurs la considèrent comme une forme extra-génitale ou aberrante du sarcome de Sticker apparue en l'absence de toute lésion génitale.

Il s'agit de néoplasies apparaissant sous la peau, pouvant atteindre un volume important et qui dans certains cas donnent des métastases sous la peau ou dans les organes internes ou les deux. Au point de vue histologique elles présentent l'image d'un sarcome réticulaire.

I. — TRAVAUX ANTERIEURS

1° Le réticulo-sarcome cutané du Chien a été cité par les auteurs qui ont fait des statistiques parmi les tumeurs du Chien (ANTOINE, LIEGEOIS et VERSTAETE 1934, Mac CLELAND 1940) ou parmi les réticuloses des animaux domestiques (DRIEUX 1949).

Il semble que le premier cas se rapprochant de cette affection ait été décrit par VERLINDE et WINSSER en 1947 à propos d'un réticulo-endothéliome malin localisé à la peau, les ganglions régionaux et le péritoine d'un Fox-terrier de 6 ans. Cliniquement et histologiquement la tumeur ressemblait au granulome malin de l'homme, le mycosis fongoïde.

Le premier auteur qui ait fait une étude approfondie de la question a été OTTOSEN (1949). Sur 200 cas de tumeurs de la peau du Chien, il a classé 93 cas de sarcomes dont la majorité était des réticulo-sarcomes, c'est-à-dire des sarcomes plutôt primitifs dans lesquels on peut mettre en évidence par imprégnation argentique un réseau intercellulaire de fibrilles de réticuline. Ces tumeurs apparaissent principalement dans le chorion. OTTOSEN les considère comme plutôt bénins pourvu qu'on les enlève à leur stade précoce et insiste sur leur ressemblance avec le sarcome de Sticker.

En 1953 DRIEUX et col. ont décrit trois cas de réticulo-sarcomes histiocytaires apparus sur la peau de chiens.

GENTILE en 1955, PEZZOLI en 1956 ont décrit des cas semblables.

RENK en 1958 rapporte 2 cas de prolifération de cellules réticulaires donnant des nodules multiples dans le tissu sous-cutané et les organes viscéraux d'un Collier de 8 ans et sous la peau et la cavité crânienne d'un Boxer de 8 ans également.

La même année CRETZEANU, PASTEA et MAY décrivent une excellente observation d'une femelle Berger d'Alsace, âgée de 6 mois, qui présentait de nombreux nodules multiples, fermes, adhérents à la peau de la tête, du tronc et des membres. A l'autopsie on trouvait les mêmes nodules dans le poumon, la rate et l'intestin.

En 1959 LOPPNOW et NIEMAND ont décrit 3 cas de réticulo-sarcomes chez le Chien. Dans les trois cas les tumeurs primaires étaient solitaires, récidivantes et métastasiaient sous la peau.

En 1960 CHELI a décrit des réticulo-endothéliomes simples ou mixtes, avec ou sans métastases chez 11 chiens et 1 vache. Les sites primaires étaient la peau, le muscle, le péritoine, la mamelle et l'os.

2° D'un autre côté en 1929 FELDMAN a décrit un cas apparemment spontané de sarcome de Sticker chez un Chien qui n'avait pas de tumeur dans la sphère génitale. A la place il y avait une tumeur dans un des espaces orbitaires et une autre sous la peau dans la région frontale gauche. La transplantation n'a pas été essayée, mais FELDMAN considère l'histologie comme suffisante pour établir le diagnostic de lympho-sarcome transmissible. Il a émis l'hypothèse que les tumeurs furent contractées à partir de la mère lors du part.

AJELLO en 1939 a décrit 3 cas de tumeurs multiples de la peau chez des chiens qui étaient indemnes au point de vue génital.

En 1947 LACROIX et RISER font état de 52 « transmissible lymphosarcomes » du Chien. Sur ce nombre 2 seulement affectaient le pénis, tous les autres se trouvaient localisés à la tête, au tronc ou aux membres.

Enfin ,PAROT en 1954 dans sa thèse décrit 2 cas de tumeurs sous-cutanées dont l'histologie était identique au sarcome de Sticker, en l'absence de lésions sur l'appareil génital.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

De l'exposé bibliographique précédent se dégagent trois faits : les travaux tant sur le réticulo-sarcome cutané du Chien que sur les formes extra-génitales du sarcome de Sticker sont peu nombreux et ils sont dans l'ensemble récents. Enfin les auteurs ont étudié ces tumeurs sur le plan anatomo-clinique seulement.

Nous avons eu l'occasion d'en observer un certain nombre de cas, en fait autant que de sarcomes de Sticker naturels, et nous avons tenté de préciser la nature de la maladie par la méthode expérimentale : greffes, culture « in vitro », inoculations a-cellulaires.

1. — Cas observés

Nous avons observé 30 cas de cette affection. Cinq proviennent de la collection de Monsieur le Professeur MONTPELLIER, les autres de notre

collection personnelle. Les pièces anatomiques nous ont été envoyées pour analyse par des vétérinaires d'Algérie ou ont été prélevées par nous-même.

Nous indiquons dans des tableaux les localisations, la répartition suivant la race et suivant l'âge.

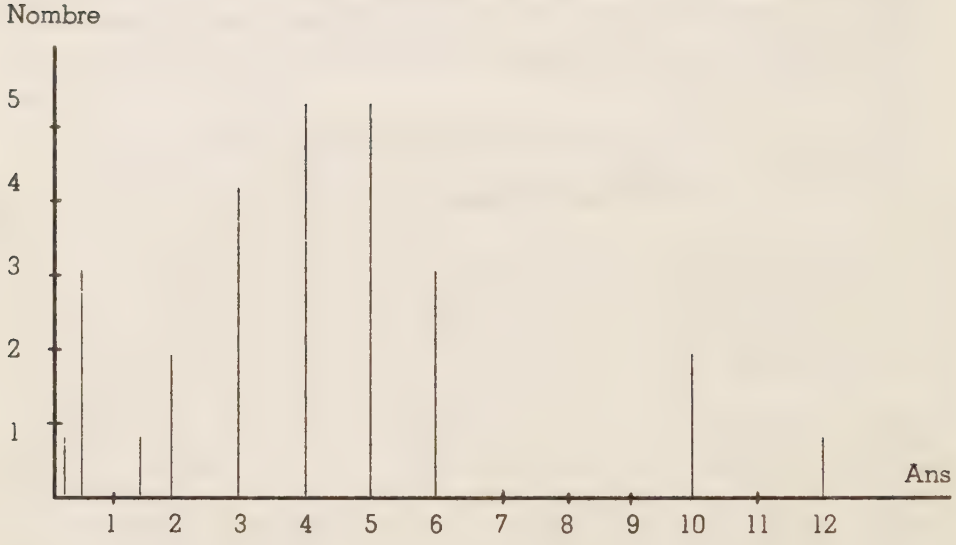
Localisation du réticulo-sarcome cutané

Epaule	5
Coude	2
Avant-bras	1
Doigt de la main	1
Cuisse	2
Genou	1
Jarret	1
Oreille	2
Lèvre	2
Encolure	2
Flanc	2
Scrotum	1
Nodules multiples	10

Répartition suivant la race

Cocker	5
Boxer	4
Fox	4
Berger Allemand	2
Races diverses	5
Sans origine propre	10

Répartition suivant l'âge



2. — **Anatomo-clinique**

Cette tumeur se présente sous deux aspects principaux au point de vue clinique.

Dans le cas général on a affaire à une tumeur plus ou moins sphérique, plus ou moins bosselée, ferme au toucher, adhérente à la peau, mobile sur le plan profond, qui peut être située n'importe où avec peut-être une prédominance pour la région de l'épaule. Sa taille peut aller de 1 cm à 20 cm, formant alors une énorme masse bosselée, adhérente aux plans musculaires. L'exérèse est facile dans le cas de tumeur de petite taille, délicate quand les mucles sont infiltrés. La section de ces tumeurs montre une surface blanche ou rosée en règle générale (Figures 41 et 42).

On a aussi un deuxième type morphologique qui peut ou apparaître d'emblée ou dans un second temps après la formation d'une grosse tumeur primaire. Il s'agit de petits nodules sous-épithéliaux, intra-dermiques, non adhérents au tissu conjonctif sous-jacent. Ils ont une forme discoïdale, avec un diamètre allant de 10 à 25 mm, une épaisseur variant de 3 à 10 mm. On les voit sur les races à poil ras, sinon ils sont cachés sous les poils et seule la palpation les révèle (Figure 43).

A partir d'un certain moment leur centre s'ulcère et se creuse en cratère. Ils sont indolores, mais parfois prurigineux. Leur nombre peut varier de 3, 4, 10 à plus de 100. A ce stade la mort est inéluctable à bref délai.

Que ce soit le cas d'une tumeur unique du premier type ou le cas des nodules dermiques, on ne voit jamais de capsule fibreuse entourant la tumeur.

Chaque fois que nous avons pu avoir une observation détaillée nous avons pu remarquer qu'il y a ou rechute locale ou récidive à distance après

exérèse. Il s'agit donc d'une tumeur maligne dont l'évolution se termine par la mort de l'animal.

A l'autopsie, à l'ouverture du cadavre ou bien on ne voit rien de particulier ou bien on constate des métastases au foie, au rein et au poumon.

A côté de ces cas de tumeurs externes, il existe des réticulo-sarcomes internes qui atteignent la rate, le foie, le rein ou le poumon mais sans aucuns signes externes.

Nous étudierons quelques cas particuliers.

Cas 1783. — Il s'agit d'une chienne SOP, âgée de 5 ans qui a déjà été opérée 2 fois par un vétérinaire quand on nous la présente. On voit une grosse masse tumorale en avant de l'épaule, de 10 cm de diamètre, fistulisée, creusée de cratères par où s'écoule un pus nauséabond. Après traitement aux Rayons X (3.000 r en 12 séances) on constate la fermeture des cratères et une cicatrisation de la peau, la masse tumorale a légèrement diminué de volume. Par contre apparaissent 15 jours après la fin du traitement des nodules cutanées. L'animal meurt d'une crise cardiaque en montant un escalier. Nous n'avons pu faire l'autopsie. A la palpation on n'avait pas décelé de tumeur intra-abdominale.

Cas 1838. — Il s'agit d'un Cocker spaniel, mâle, âgé de 5 ans, qui nous est présenté après avoir déjà subi l'exérèse d'une tumeur à l'épaule. Cet animal en bon état général, porte une volumineuse tumeur en avant de l'épaule, de la grosseur du poing, ulcérée, non adhérente aux muscles. L'exérèse serait possible, mais le propriétaire de l'animal, médecin et cancérologue de surcroît s'y oppose. Nous traitons aux Rayons X (4.000 r en 20 séances). Il n'y a pas eu de modifications du volume de la tumeur, par contre dès la fin du traitement il y a apparition de petits nodules cutanés qui s'ulcèrent. On assiste à une véritable explosion de ces nodules et en 15 jours on arrive à en compter plus de 200. A ce moment bien que l'animal soit encore gai et ait conservé son appétit, le propriétaire nous le fait sacrifier. Il s'oppose à l'autopsie. A la palpation sur l'animal mort et flasque on ne perçoit rien dans l'abdomen.

Cas 1848. — Il s'agit d'une chienne Berger Allemand, âgée de 4 ans, qui présente une énorme tumeur en avant de l'épaule, le long du sus-épineux et du deltoïde inférieur qui sont infiltrés. Cette tumeur dure, bosselée, mesure 20 cm dans son grand axe, 10 dans le petit.

Elle est enlevée le 10-7-1958, elle pèse 2 kilogs. La cicatrisation se fait en 15 jours A ce moment on traite aux Rayons X (4.000 r).

Le traitement n'empêche pas la tumeur de rechuter et deux mois après l'exérèse elle a repris son volume primitif. Un mois après la fin du traitement apparaissent des nodules cutanés. A ce moment l'animal brusquement cesse de manger, dépérit et meurt en 8 jours. A l'autopsie nous n'avons pas vu de métastases internes.

Cas 2016. — Il s'agit d'un chien militaire Berger Allemand, mâle, âgé de 5 ans, que nous avons suivi pendant quelque temps et que nous avons fini par sacrifier. Il présentait de nombreuses tumeurs cutanées de la grosseur d'un pois à une noisette réparties surtout sur les épaules, plus clairsemées sur le reste du corps. A l'autopsie on remarquait d'abondants nadules tumoraux localisés sur les reins, le foie, le mésentère, l'estomac, le poumon. le cœur, les muscles abdominaux. Il s'agit là d'un cas extrême.

3. — **Histologie pathologique**

En ce qui concerne l'histopathologie, ces tumeurs présentent les mêmes caractères. Ce sont des tumeurs homogènes, très richement cellulaires, constituées de vastes nappes d'éléments que soutiennent des axes conjonctifs généralement minces et délicats (Figures 44 et 45).

Au point de vue cellulaire, il s'agit d'éléments monomorphes. Les noyaux

sont pour la plupart arrondis ou ovoïdes, parfois encochés, éventuellement irréguliers. La membrane nucléaire est bien marquée ; la chromatine disposée surtout en bordure, parfois croûtelleuse d'où l'aspect clair des noyaux avec mottes chromatiniennes et nucléole.

Le cytoplasme, légèrement basophile, moyennement développé offre des contours nets. Il s'agit d'éléments jeunes, indifférenciés, séparés les uns des autres.

Sur les frottis et applications colorés au Giemsa on a le même type de cellules avec un cytoplasme assez abondant aux limites régulières, en général homogène, avec quelquefois des vacuoles. Le noyau est central, rond ou ovale, avec une chromatine disposée en mottes, toujours nucléolé.

On ne voit jamais de granulations métachromatiques.

La monotonie cellulaire et le monomorphisme nucléaire signent les cellules réticulaires.

La masse tumorale est peu vascularisée. Le réseau de réticuline est un peu plus important que dans le sarcome de Sticker. Il s'agit là d'un réticule-sarcome indifférencié dictyocytaire.

Le sarcome de Sticker est un peu plus polymorphe, réticulo-histiocyto-sarcome. En fait ce sont des affections appartenant à une même famille histo-pathologique, il n'y a entre elles que des nuances.

Ceci n'est qu'un schéma général applicable à la majorité des cas. Parfois les cellules réticulaires sont reliées par des ponts cytoplasmiques donnant par place un aspect syncitial, nous aurons alors une forme de réticulo-sarcome dictyo-syncitiale. Dans d'autres cas se surajoutent des cellules à cytoplasme clair vacuolé, rappelant l'histiocyte ; nous aurons alors une forme de réticulo-histiocyto-sarcome et il est alors impossible de faire une distinction entre le réticule-sarcome cutané et le sarcome de Sticker.

Corps d'inclusion. — Dans presque toutes les coupes histologiques que nous avons examinées, à côté d'inclusions cytoplasmiques variées telles que cellules entières, noyaux ou hématies, on trouve des inclusions de type particulier.

Il s'agit de corps sphériques de deux sortes :

a) **Inclusions acidophiles.** — Ce sont des corpuscules arrondis, à contour net, entourés d'un halo clair. La structure est presque toujours homogène, parfois nous en avons rencontré de granuleux. Ils se colorent en rouge clair à l'hémalun-éosine, en rouge brique au Mann, un peu plus pâle avec la coloration de Lépine et Sautter, ils sont Feulgen négatifs (Figure 46).

Leurs dimensions varient de 2 à 4 μ,, parfois ils atteignent 5 à 6 μ. Pour une tumeur donnée leurs dimensions sont assez homogènes, il n'y a pas de grandes variations de taille.

Leur siège est toujours intracytoplasmique, jamais nucléaire.

b) **Inclusions basophiles.** — Elles sont en général plus grandes que les précédentes. Elles évoquent l'inclusion en œil de pigeon de Leyden. Elles sont rondes ; leurs dimensions vont de 4 à 8 μ. Elles sont souvent proches du noyau qu'elles dépriment. Elles ont ou une structure homogène ou parfois offrent l'aspect que l'on retrouve dans certains nucléoles du sarcome de Sticker ou du réticulo-sarcome cutané en culture de tissus, où l'on distingue des grains éosinophiles à l'intérieur. Elles sont Feulgen-positives. Il arrive que

dans certaines cellules on trouve les deux inclusions côte à côte chacune entourée d'un halo clair (Figure 47).

Ces deux sortes d'inclusions existent dans les tumeurs solitaires aussi bien que dans les nodules cutanés métastatiques.

Elles se différencient nettement des débris cellulaires phagocytés ou des hématies. Les caractères tinctoriaux, la structure et la forme en sont différents.

Nous pensons qu'il y a de fortes analogies entre ces inclusions et les inclusions virales.

Les virus oncogènes comme bien d'autres virus sont à l'origine d'inclusions cytoplasmiques ou nucléaires, fibrome de Shope, cancer rénal de la grenouille, verrue de l'homme. Le virus de la papillomatose infectieuse buccale du Chien provoque de gros corps d'inclusion basophiles dans le noyau. GUERIN a décrit des corps d'inclusion acidophiles dans le cytoplasme des épithéliomas mammaires de la souris.

Dans le cas du réticulo-sarcome cutané il est possible qu'il s'agisse d'un virus de passage, il peut se faire aussi que ces inclusions soient la signature d'un virus oncogène.

4. — **Greffe homologue du réticulo-sarcome cutané.**

A notre connaissance cette tumeur n'a jamais été greffée. Nous avons essayé à plusieurs reprises de la transmettre au Chien adulte sans succès. Nous n'avons réussi le passage qu'à partir du moment où nous avons soumis des chiots à l'irradiation générale, technique employée par ALLAM et col. pour transmettre leur carcinome n° 1 chez le Chien.

a) Matériel et méthode

1° **Chiens donneurs**

Nous avons eu à notre disposition 4 animaux sur lesquels nous avons pu pratiquer à volonté l'exérèse des tumeurs :

chiens 1838 et 1848 en 1958,
chien 1937 en 1959,
chien 2016 en 1960.

2° **Chiens receveurs**

Comme nous l'avons vu précédemment pour le sarcome de Sticker ces animaux provenaient de la fourrière municipale d'Alger, jeunes en général (1 à 2 ans). Dans un cas nous avons eu des chiots nés à l'Institut Pasteur âgés de 3 semaines au moment de l'expérience.

3° **Méthode**

La chienne 1848 porteuse d'une volumineuse tumeur de l'épaule a été opérée sous anesthésie générale et au bistouri électrique. Les autres animaux étaient porteurs de nodules sous-cutanés. Après désinfection de la peau et anesthésie locale à la Scurocaïne nous avons pratiqué l'ablation de nodules

non ulcérés au bistouri normal pour ne pas léser les tissus. Chaque nodule donnait un volume utilisable de 1 à 2 ml, 5 à 6 nodules étaient prélevés en même temps.

Les tumeurs lavées dans le liquide de Hanks ont été broyées à la presse de Fischer et mises en suspension dans un volume double ou triple de liquide de Hanks. Dans certains cas nous avons inoculé des cellules trypsinées dont une partie avait servi à faire des cultures « in vitro » une heure avant.

4° Inoculations

1) E 221, 8-7-1958.

A partir du chien 1838, 3 chiens sont inoculés. l'un avec le broyat de nodules cutanés, le 2e avec des cellules trypsinées (400.10^6 cellules), le 3e avec le mélange cellules trypsinées et broyat tumoral.

2) E 237, 24-9-1958.

Les mêmes animaux sont réinoculés chacun avec 1 ml de broyat de la même tumeur, l'animal donneur venant d'être sacrifié 1 heure avant.

3) E 223, 10-7-1958.

A partir du chien 1848. Comme dans l'expérience précédente 3 chiens neufs sont inoculés avec le broyat tumoral, des cellules trypsinées (30.10^6) ou le mélange des deux.

4) E 238 A, 25-9-1958.

A partir du chien 1848. La tumeur de l'épaule a repris son volume primitif en un mois et demi. Les 3 chiens précédents sont réinoculés avec un broyat tumoral de même que 5 chiens neufs (1 ml de suspension cellulaire).

5) E 326, 9-12-1959.

A partir des nodules cutanés du chien 1937, 4 chiens sont inoculés sous la peau.

6) E 436. 21-11-1960.

A partir du chien 2016. Nous avons prélevé une vingtaine de nodules sous-cutanés. Le broyat a été inoculé à 4 chiots âgés de 3 semaines. 3 de ces chiots ont reçu 5 heures auparavant une irradiation totale de 200 r (200 KV, 12 mA, filtre 0,5 Cu, 1 Alu, distance anti-cathode 50 cm). Un chiot malade n'est pas irradié; il meurt le 3e jour d'ascaridiose (l'inoculum est entièrement nécrosé).

b) Résultats

Dans les 5 premières expériences 15 chiens neufs ont été inoculés sous la peau avec des broyats de tumeurs cutanées, 6 d'entre eux réinoculés. Toutes les greffes ont été négatives. Dans l'expérience 6, dès le 3e jour, on ne sentait presque rien à la palpation au point d'inoculation.

Chez le chien 1 à partir du 7e jour on sent un petit nodule comme un grain de riz qui va croître presque à vue d'œil doublant de volume chaque jour pour atteindre le 15e jour une taille de 5 × 2 × 2 cm. Une ponction à la seringue nous montre une plage de cellules homogène, caractéristique du réticulo-sarcome cutané sans éléments inflammatoires. Il ne s'agit donc pas d'un abcès, mais d'une tumeur vraie. A partir du 20e jour cette tumeur va diminuer de volume aussi vite qu'elle a grandi. Le 28e jour la tumeur a perdu les 9/10e de son volume. On en fait l'exérèse; 1 ml environ est broyé aux ciseaux fins et l'inoculation est faite sous la peau de 2 jeunes chiens irradiés 5 heures avant (300 r) et ayant reçu chacun 25 mg de cortisone (E 445).

Le chien 2 a eu un processus analogue, mais avec une tumeur plus petite (2 cm à son maximum).

Le chien 3 a été négatif.

Au point de vue anatomo-pathologique chez les chiens 1 et 2 des ponctions-biopsies font ressortir l'identité des cellules avec celles du chien donneur. Chez le chien 1 lors de l'exérèse un fragment a été inclus et coupé. Un stroma conjonctif riche en collagène et fibroblastes délimite des logettes où l'on voit des plages homogènes de cellules tumorales, images du réticulosarcome cutané. On a l'impression que l'organisme s'est défendu en cherchant à éliminer ces cellules étrangères.

Des 2 chiens inoculés lors du second passage un seul va donner un petit nodule de quelques mm vers le 20e jour, vérifié toujours par ponction, et qui va disparaître vers le 35e jour.

En comparaison avec le sarcome de Sticker, nous voyons que cette tumeur se transmet difficilement par greffe, ce fait est statistiquement significatif. Dans nos greffes de sarcome de Sticker, il nous est arrivé de voir une série de 3 chiens entièrement négatifs, des séries où 1 voire 2 chiens étaient négatifs, jamais un tel échec systématique et ce avec des techniques de greffes identiques.

Seuls des chiots irradiés ont donné des résultats partiels en ce sens que les greffes ont régressé. Les nodules sous-cutanés, métastases du sarcome de Sticker ont pu être transmis en série sur des animaux adultes et sans l'artifice des Rayons X. Il y a là un fait biologique patent.

5. — **La culture « in vitro » du réticulo-sarcome cutané**

A notre connaissance aucun travail n'a jamais été publié sur cette question.

a) Matériel et méthode

1° **Matériel tumoral**

Nous avons utilisé 4 chiens porteurs soit de tumeurs volumineuses, soit de nodules tumoraux cutanés : chien 1783, 1838, 1848 et 2016.

2° **Milieux de culture**

Les produits utilisés : sérum, milieux physiologiques, trypsine ont été décrits au chapitre II.

3° **Méthode**

Nous avons employé deux méthodes : la méthode des explants sur plasma de poulet et celle par trypsination.

Dans les deux cas le milieu utilisé a été le mélange liquide de Hanks et sérum de poulain avec en plus dans certains cas de l'extrait embryonnaire de poulet.

b) Résultats

Nous avons fait 4 expériences avec la méthode des explants ; toutes

ont été positives, les fragments s'entourant d'une frange de cellules qui se sont multipliées les jours suivants.

Nous avons fait 4 expériences par trypsination. L'une a été négative, dans les 3 autres nous avons obtenu un tapis cellulaire.

1° Développement des cultures

Méthode des explants. — Comme dans le sarcome de Sticker, des cellules se détachent du fragment explanté et croissent en direction radiaire d'une façon luxuriante. Les cellules ont l'allure de fibroblastes au voisinage de l'explant, mais s'étalent à la périphérie.

Trypsination. — Dans les jours qui suivent les cellules s'étalent sur le verre et entrent en mitose. On arrive à avoir un tapis le 7e jour. Les cellules sont grandes, de forme triangulaire ou quadrangulaire, peu gardent l'allure de fibroblastes. Dans une seule de nos expériences nous avons réussi à faire d'autres passages (3). Nous pensons que la cause en est la nature de notre milieu trop simple. Chronologiquement ces expériences sont antérieures à celles que nous avons faites avec le sarcome de Sticker.

2° Morphologie des cellules

Les cellules étalées sur le verre ont une grande taille 30 à 60 μ. Elles possèdent un noyau ovalaire mesurant de 10 à 15 μ de longueur, 6 à 8 de large. Le noyau est pourvu d'un ou de deux nucléoles. Peu de noyaux présentent des anomalies.

On distingue trois zones dans le cytoplasme :

— une zone en forme de casque bordant le noyau, homogène, avec quelques grosses mitochondries,

— une zone entourant le noyau et la zone précédente avec une structure granuleuse,

— une zone hyaloplasmique externe pourvue de chondriocontes, émettant de fins pseudopodes et possédant de fines gouttelettes de graisse neutre.

A côté d'inclusions macrophagiques on note parfois dans la zone intermédiaire des inclusions entourées d'un halo clair, éosinophiles, Feulgen-négatives. Ces inclusions sont formées d'un agglomérat de fines granulations à la limite de visibilité.

c) Remarques

En comparant par la suite la morphologie de ces cellules avec celles du sarcome de Sticker, hormis le cas des inclusions, nous n'avons pas vu de différences marquantes. Les cellules sont identiques quant à la forme, aux dimensions et aux divisions du cytoplasme.

Nous n'avons pas étudié l'athrocytose chez ces cellules, mais elles sont capables de croître sur simple milieu liquide de Hanks et sérum de cheval (5 expériences). Elles possèdent au moins deux des caractères de l'état histiocytaire : le pouvoir de prolifération par simple utilisation des protéines sériques et le pouvoir de phagocytose.

6. — **Essais de transmission a-cellulaire**

Dans le même temps que nous tentions de réaliser des greffes de ces tumeurs cutanées du Chien et malgré nos échecs, nous en avons tenté la transmission a-cellulaire. Des filtrats ou des surnageants de broyats centrifugés ont été inoculés à des chiens, des souris ou des œufs embryonnés.

a)Matériel et méthode

1° **Inoculation au Chien**

Nous avons employé les tumeurs des chiens 1838 et 1848 soit dès après l'exérèse, soit congelées à — 80 °C.

Nous avons fait 5 expériences portant sur l'inoculation du broyat de tumeur centrifugé à 3 000 tours/minute pendant 15 minutes. Les broyats ont été mis en suspension dans le sérum physiologique, le PBS ou l'eau distillée.

Nous avons inoculé 5 chiens adultes, 8 chiots âgés de 1 mois, 3 chiots âgés de 4 jours par voie sous-cutanée, intradermique ou intraveineuse.

2° **Inoculation à la Souris**

Dans une expérience le broyat centrifugé de la tumeur 1848 a été inoculé à des souris de un mois :

16 sous la peau dont 8 avec adjonction de Kieselguhr,

10 par voie intracérébrale.

3° **Inoculation à l'œuf embryonné**

Nous avons employé des œufs de New-Hampshire sélectionnés en provenance d'un élevage de la région algéroise.

Les inoculations ont été faites dans la membrane chorio-allantoïdienne ou dans le vitellus. Les inoculums provenaient de broyats congelés à — 80 °C, tirés des tumeurs des chiens 1838 et 1848 ou des cellules trypsinées du chien 1848 congelées à la même température ainsi que pour nos deux dernières expériences de deux tumeurs 1937 et 2016 congelées entières à — 27 °C et broyées au moment de l'emploi.

Les témoins recevaient le même volume de sérum physiologique ou de liquide de Hanks.

L'incubation a varié de 8 à 11 jours. Les œufs ont été mirés matin et soir. Sur les œufs morts on a prélevé l'embryon et la membrane chorio-allandoïdienne qui ont été broyés en vue de passages successifs, et dans certains cas le broyat a été filtré.

b) Résultats

1° **Inoculation des chiens et des souris**

De tous les chiens inoculés aucun n'a présenté de signe de néoplasie quelconque. Ils ont tous vécu plus de 6 mois sauf les chiots nouveau-nés qui sont morts d'ascaridiose le 5e mois.

Aucune souris n'a présenté de tumeurs.

2° **Inoculation de l'œuf embryonné**

Les examens bactériologiques des œufs après inoculation ont été négatifs.

Nous avons résumé les expériences dans un tableau. Nous n'avons pas mentionné les deux essais faits avec les tumeurs des chiens 1937 et 2016 qui ont été négatifs.

Sur 61 œufs inoculés, 53 sont morts en 2 à 5 jours avec des lésions congestives ou hémorragiques. Les témoins sont tous arrivés à terme. Il semble que la mortalité soit accrue avec des œufs de 8 jours d'incubation par rapport à ceux de 11 jours.

Dans la 3e série faite à partir de cellules trypsinées congelées à— 80 °C les deux derniers passages ont été faits après filtration sur bougie L3.

Nous pensons que la mort des embryons est due à un agent ultrafiltrable.

Dans la première série d'essais, à l'issue du dernier passage le broyat d'un embryon et de la membrane chorio-allantoïdienne en suspension dans le sérum physiologique a été centrifugé à 10 000 tours/minute, 30 minutes. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 40 000 tours/minute, 20 minutes (centrifugeuse Spinco). Le culot remis en suspension dans l'eau distillée a été examiné au microscope électronique (Philips 75, Laboratoire de Microscopie Electronique de l'Ecole Nationale d'Agriculture de Maison-Carrée, M. DUCELLIER). Compte tenu du faible grossissement de l'appareil, on voit un semis de particules de taille assez homogène, de 40 à 50 mμ de diamètre qui évoquent des particules virales.

A la suite d'un accident de congélation nous avons perdu tout notre matériel et ces expériences ont été interrompues.

c) Discussion

Nous avons cherché, comme nous l'avons écrit plus haut à propos du sarcome de Sticker, à reproduire les expériences faites par le groupe LASSERRE à Toulouse en 1951 qui a réussi à faire des embryocultures à partir de tumeurs vénériennes.

Chronologiquement le début de nos expériences sur le réticulo-sarcome est antérieur à celles faites sur le sarcome de Sticker. A cette époque nous avons pu bénéficier de glace carbonique pour nos congélations.

Bien que le nombre d'œufs utilisés ait été faible, il semble bien que les tumeurs aient hébergé un virus. Mais il nous est impossible de dire s'il s'agissait d'un virus véhiculé par les tumeurs ou de l'agent de ces tumeurs.

7. **Nature du réticulo-sarcome cutané du Chien**

Le réticulo-sarcome cutané est caractérisé par la présence de tumeurs à point de départ unique sur l'étendue du territoire cutané.

Certains ont considéré ces tumeurs ou ces nodules sous-cutanés comme une forme particulière du sarcome de Sticker, FELDMAN par exemple ou MONTPELLIER. On les a considérées comme des formes atypiques ou aberrantes, résultat d'une greffe de cellules tumorales sur une plaie cutanée.

Quand on voit la facilité avec laquelle se greffe le sarcome de Sticker, l'hypothèse d'une greffe cutanée est séduisante.

		Matériel	Méthode	Incubation	Nombre d'œufs inoculés	Résultats	Nombre d'œufs témoins	Résultats
Exp. 1	Passage 1	Tumeur 1848 Broyat centrifugé conservé à — 80° 40 jours	MCA	11 jours	10	6 morts le 3e jour hémorragiques	5	Tous vivants à terme
	Passage 2	MCA des œufs précédents broyée centrifugée	MCA	11 »	12	8 morts le 3e jour dont 6 hémorragiques	6	»
	Passage 3	MCA des œufs précédents broyée et centrifugée	MCA	11 »	8	7 morts le 3e jour hémorragiques	6	»
Exp. 2	Passage 1	Tumeur 1838 Broyat centrifugé conservé à — 80° 2 mois	Vitellus	11 »	18	5 morts en 4 jours congestifs	8	»
	Passage 2	Embryons précédents broyat centrifugé	MCA	8 »	14	9 morts en 5 jours hémorragiques	6	»
Exp. 3	Passage 1	Tumeur 1848 cellules trypsinées congelées à — 80° 10 mois	MCA	9 »	12	8 morts en 4 jours hémorragiques	6	»
	Passage 2	Embryons précédents broyat centrifugé	MCA	8 »	17	17 morts en 48 heures hémorragiques	7	»
	Passage 3a	Embryons précédents broyat centrifugé	MCA	9 »	8	8 morts en 48 heures hémorragiques	6	»
	Passage 3b	Embryons Passage 2 broyat filtré sur bougie L3	MCA	8 »	17	14 morts en 48 heures hémorragiques	7	»
	Passage 4	Embryons précédents broyat filtré sur bougie L3	MCA	8 »	7	6 morts en 48 heures hémorragiques	4	»

Or, on est surpris de constater qu'il existe une sorte d'antinomie entre ces deux affections. Dans les pays où le sarcome de Sticker est banal, on voit peu de réticulo-sarcome de la peau. Au Danemark au contraire, où le sarcome de Sticker est rare (KAALUND-JORGENSEN et THOMSEN), OTTOSEN a vu 67 cas de réticulo-sarcome sur 101 cas de tumeurs mésenchymateuses de la peau chez le Chien. En Algérie on voit peu de sarcome de Sticker. Si nous avons été obligé de créer une souche de tumeurs greffées, c'est parce que justement il y est rare. Or nous avons rencontré plus de cas de réticulo-sarcome de la peau que de cas de sarcome de Sticker.

Ce sarcome se greffe difficilement chez le Chien. Nous n'avons réussi la greffe que sur des chiots irradiés. Par contre la greffe des métastases cutanées du sarcome de Sticker est réalisable, qu'il s'agisse de métastases de tumeurs naturelles (AJELLO, 1936) ou de tumeurs greffées chez le Chien ou le Chacal (Chapitre I).

Le sarcome de Sticker est une tumeur très radio-sensible : 600 à 800 r suffisent à faire disparaître des polypes de la verge ou du vagin.

De ce que nous pouvons juger par notre expérience personnelle, le réticulo-sarcome cutané n'est pas radio-sensible. Nous avons traité 8 cas à des doses allant de 3 000 à 4 000 r sans aucun résultat. Or, dans la moitié des cas, les tumeurs étaient de faible volume et solitaires. Trois fois après l'application des Rayons on a vu une explosion de nodules cutanés métastatiques.

Il est incontestable qu'au point de vue anatomo-pathologique pur, l'aspect microscopique de ces tumeurs est à peu près identique au sarcome de Sticker. Cependant on y rencontre presque toujours des corps d'inclusion intracytoplasmiques.

L'anatomie pathologique ne peut servir de critère entre les deux affections. Ainsi nous jugeons utile de rapporter l'observation suivante :

Le 10-6-1959 nous avons prélevé des polypes du vagin sur une chienne et nous les avons greffés au Chacal, puis la chienne a été irradiée et il y a eu guérison.

Un an et demi après cet animal a été sacrifié parce qu'il présentait une énorme tumeur cutanée au flanc, dure, bosselée et des masses intra-abdominales. Ces masses se sont révélées être des tumeurs de l'ovaire et du rein. Des greffes faites sur 3 chiens à partir de la tumeur cutanée ont été négatives. Histologiquement il s'agissait d'un réticulo-histiocyto-sarcome. Le vagin était absolument indemne.

Pour nous qui connaissions les antécédents de l'animal, il s'agissait d'une récidive de sarcome de Sticker, mais pour celui qui ne les aurait pas connus, il se serait agi d'un réticulo-sarcome cutané et viscéral.

De même les cellules en culture « in vitro » ne montrent pas de différences frappantes à l'exception de corps d'inclusion intracytoplasmiques.

En 1951 LASSERRE et col. ont obtenu des embryocultures virulentes à partir de filtrats de tumeur de Sticker. Nous avons échoué en cherchant à reproduire leurs expériences, par contre nous les avons obtenues avec le réticulo-sarcome cutané.

Enfin, il existe un point commun important entre les deux affections : l'apparition de nodules cutanés multiples dans le sarcome de Sticker naturel ou greffé et le réticulo-sarcome cutané.

Ces deux tumeurs qui ont pu être confondues au nom de l'anatomie pathologique présentent au point de vue expérimental des points de rapprochement et des points de divergence.

S'agit-il de manifestations différentes d'une même maladie causée par un agent oncogène. Dans certains cas cet agent donnerait une tumeur vénérienne capable de donner des métastases sous la peau, dans d'autres une tumeur apparaîtrait d'emblée sous la peau. Les leucémies lymphoïdes aviaires se présentent sous des formes cliniques différentes bien que causées par le même virus, quant au Polyoma son nom indique la diversité d'aspect des tumeurs causées par ce virus.

Nous pensons qu'à l'heure actuelle nous pouvons faire du réticulo-sarcome cutané une entité à part : il s'agit d'un type de réticulo-sarcome qui est localisé à la peau.

Nous n'avons que des présomptions sur son origine virale. Des inclusions, même si on les trouve dans la plupart des ces tumeurs ne sont d'abord pas forcément la signature d'un virus, et ensuite n'apportent pas la preuve que ce virus soit oncogène. Des embryocultures virulentes, si elles plaident en faveur d'un virus, ne sont pas la preuve que ce virus soit oncogène tant qu'on n'a pas reproduit la tumeur.

Néanmoins nous estimons être en droit de formuler l'hypothèse que cette tumeur, le réticulo-sarcome cutané du Chien, est d'origine virale.

B. — LE MASTOCYTOME

Le mastocyte ou labrocyte, mastcell, mastzelle découvert par EHRLICH en 1878 est un des constituants cellulaires du tissu conjonctif avec les fibrocytes, histiocytes et plasmocytes. On le trouve dans toutes les classes de Vertébrés (ARVY, 1955) réparti dans tous le corps. Chez le Chien il est particulièrement fréquent dans la peau et le foie. C'est une cellule à noyau rond ou ovoïde caractérisée par l'abondance de granulations cytoplasmiques métachromatiques qui contiennent 3 substances biologiques actives : héparine, histamine et acide hyaluronique. Les tumeurs à mastcells ont été identifiées pour la première fois par BLOOM en 1942 chez le Chien. Le premier cas observé chez l'Homme a été décrit par HISSARD en 1950. On les a observées chez la Souris où elles ont pu être transmises en série (DUNN et POTTER, 1957 ; FURTH, HAGEN et HIRSCH, 1957).

En 1942 BLOOM a présenté la première description détaillée de cette tumeur et a créé le terme de **mastocytome.** Parmi 49 tumeurs primitives cutanées il en trouva 5 avec un type histologique particulier. Dans 3 cas il s'agissait de tumeurs solitaires, de petite taille, sous-cutanées, et dont l'élément cellulaire principal était le mastocyte. Dans 2 cas il s'agissait de tumeurs multiples. Le chien était couvert de « nodules cutanés, sous-épithéliaux dont le diamètre variait de 6 à 36 mm, ronds ou ovales, adhérents à l'épithélium de surface, non au tissu conjonctif sous-jacent. Leur surface était plate ou arrondie ou ombiliquée. Certains nodules étaient ulcérés. Les animaux présentaient un prurit intense ». Ces nodules étaient formés d'une masse uniforme d'éléments cellulaires de 9 μ de diamètre qui étaient des

mastocytes. Dans de nombreuses cellules néoplasiques BLOOM a trouvé des corps d'inclusion ronds et des cristalloïdes en forme de bâton.

A la suite de BLOOM de nombreux auteurs en ont fait des descriptions détaillées. NIELSEN et COLE en 1958 qui pour leur part ont étudié 101 cas de cette tumeur donnent une bibliographie complète de la question. Pour notre compte personnel nous en avons observé 7 cas.

Cette tumeur semble avoir le derme pour origine. Elle se présente comme une masse pleine, plus ou moins sphérique qui fait saillie à la surface de la peau. Elle peut atteindre des dimensions assez grandes 10 à 15 cm, voire plus. Les auteurs ne sont pas tous d'accord sur son degré de malignité. Il arrive que dans certains cas, quand on fait l'exérèse d'une tumeur de petite taille, mettons 1 cm, il n'y a pas de rechute. Dans tous les autres cas il y a rechute. A l'autopsie on retrouve des métastases internes dans les ganglions, la rate, le foie ou le poumon. Sans attendre l'autopsie on voit souvent des métastases cutanées. L'apparition de nodules multiples cutanés a été signalée en particulier par PAFF, BLOOM et REILLY en 1947, WILLIS et RUDECK en 1948. MULLIGAN en 1949, BLOOM de nouveau en 1952, NIELSEN en 1952, NIELSEN et COLE en 1958, PALLASKE et HERZOG en 1963.

Au point de vue histopathologique cette tumeur est caractérisée par des masses cellulaires séparées par de fines cloisons conjonctives. Des fibres de réticuline pénètrent à l'intérieur de ces masses et les cloisonnent. Dans ces mailles de réticuline les mastocytes qui constituent l'élément fondamental de la néoplasie peuvent prendre deux aspects : ou bien ils sont séparés, écartés les uns des autres et prennent une forme sphérique, ou bien ils sont tassés les uns contre les autres, ils prennent une forme polygonale et la tumeur ressemble à s'y méprendre à un réticulo-sarcome. Il existe différents stades dans le degré de maturation des mastocytes et dans le second cas lorsque l'on ne fait pas de colorations spéciales il est difficile d'identifier ces cellules. C'est ce qui a permis à NIELSEN et COLE par exemple de revendiquer comme mastocytomes des tumeurs cutanées décrites par d'autres auteurs sous le nom de réticulo-sarcome (OTTOSEN, 1949) ou de myélosarcome (Mac-CLELAND, 1940).

Enfin, en 1959 et 1963 LOMBARD et MOLONEY ont étudié cette tumeur au point de vue expérimental. Ils sont partis d'une femelle âgée de 11 ans, porteuse de multiples tumeurs dermiques. L'analyse hématologique montrait 3 220 000 globules rouges, 59 000 globules blancs par mm^3 et parmi les blancs 65 % de neutrophiles et 23 % de mastocytes néoplasiques. Ils ont transmis cette tumeur chez le chiot par greffe d'une part sur 9 passages, par ultrafiltrat, d'autre part sur 3 passages. Au microscope électronique ces auteurs ont montré qu'il existait des particules « virus-like » dans le cytoplasme.

En cultures cellulaires le mastocytome du Chien a été étudié par PAFF, BLOOM et REILLY en 1947, WILLIAMS, LARSON et PHILIPS en 1959 qui ont établi une lignée continue et par LOMBARD, MOLONEY et RICKARD en 1963. En culture « in vitro » les cellules conservent leurs granules métachromatiques.

C. — SYNTHESE : LE SYNDROME DES HEMATODERMIES NODULAIRES MALIGNES

De l'analyse de ces trois groupes de tumeurs du Chien : sarcome de Sticker, réticulo-sarcome cutané et mastocytome, deux caractères communs se dégagent :

— d'une part elles finissent par donner des métastases multiples localisées à la peau sous forme de petits nodules dermiques,

— d'autre part elles entrent dans le cadre des tumeurs dérivées du système réticulo-histiocytaire.

Ces nodules ont un aspect caractéristique. Extérieurement ils forment de petites masses rondes qui déforment la surface de la peau et ne sont pas adhérentes aux plans profonds. En coupe, la section a la forme d'une lentille. Les cellules malignes qui siègent dans le derme, arrivent au contact direct de l'épiderme, elles n'envahissent pas l'hypoderme.

Notre expérience personnelle, les descriptions cliniques faites par des auteurs sérieux nous montrent que ces nodules partis évidemment de la taille zéro, croissent en diamètre jusqu'à un maximum de 2 à 3 cm avec une épaisseur de 5 à 10 mm en 2 à 3 jours et à ce moment ils restent stationnaires et finissent par s'ulcérer en leur centre. Leur taille ne croît plus, mais il en survient un autre dans le voisinage et ainsi de suite très rapidement. On a affaire à une sorte d'éruption très spectaculaire. Il se produit en matière de tumeurs ce qui se produit en matière de maladie infectieuse cutanée comme dans la variole par exemple.

La mort de l'animal est la règle.

Nous estimons que cette éruption de nodules peut servir à définir un syndrome que nous qualifierons d'hématodermique, de nodulaire et de malin.

Or, nous faisons les constatations suivantes :

— Le mastocytome, tumeur du Chien, a été transmis par greffes et par filtrats par LOMBARD et MOLONEY. On peut d'ores et déjà dire qu'il s'agit d'une néoplasie provoquée par un virus oncogène. Ces auteurs ont signalé des particules « virus-like » dans les coupes de tumeurs examinées au microscope électronique. Il est probable que prochainement cet agent oncogène sera identifié.

— Nous avons réussi difficilement à transmettre par greffe le réticulosarcome cutané. Nous avons établi sur œuf embryonné des cultures virulentes à partir de cette tumeur et nous avons vu dans presque toutes les coupes histologiques des inclusions cytoplasmiques. Rien ne permet d'affirmer en ce moment qu'il s'agit d'une tumeur à virus. En 1961 CAJAL et CEPLEANU ont montré que l'inoculation, sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf de poule embryonné, du produit provenant d'un cas de réticulo-sarcome cutané humain, centrifugé ou passé sur filtre Seitz, détermine des lésions à aspect de prolifération et d'infiltration qui ont pu être reproduites à travers 19 passages successifs et ils ont émis l'hypothèse de l'étiologie virale du réticulo-sarcome cutané humain. On ne peut manquer de faire un rapprochement entre l'affection du Chien et celle de l'Homme.

— De notre côté, en attaquant le sarcome de Sticker sous différents angles nous avons montré les raisons qui nous font penser que cette tumeur est causée par un agent oncogène.

Ces trois tumeurs ont en commun :

1° de donner des nodules cutanés d'un type particulier à un certain stade de leur évolution,

2° de se situer dans un même cadre nosologique comme des proliférations malignes dérivées plus ou moins directement des éléments réticulo-histiocytaires dont on sait qu'ils sont présents dans la peau.

A notre avis, il peut être un caractère commun supplémentaire et plus important encore. Nous pensons que ces tumeurs déjà comparables cliniquement et pour certains types anatomo-pathologiquement sont en rapport avec une étiologie virale. Qu'il s'agisse de virus différents ou qu'un même virus ait des points d'attaque cellulaires différents l'avenir nous le dira.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE

Nous sommes parti d'une tumeur du Chien transmissible dans la nature par le coït et expérimentalement par la méthode des greffes, bien connue au point de vue clinique, moins au point de vue anatomo-pathologique, les auteurs étant rarement d'accord sur sa véritable nature.

Le but de notre travail était, d'une part, de préciser nos connaissances sur la nature de cette maladie, d'autre part, d'essayer de mettre en évidence un agent causal.

PREMIERE PARTIE

1° Greffe du sarcome de Sticker

Cette tumeur qui est répandue dans le monde entier avec une fréquence variable selon les pays, est à notre avis assez rare en Algérie où nous avons fait nos recherches.

Nous avons établi une souche de tumeurs greffées d'une manière classique par inoculation de broyat tumoral sous la peau du Chien et accessoirement dans le péritoine.

De nombreux travaux ayant été consacrés à cette méthode nous n'attendions pas de découvertes sensationnelles. Il s'agissait avant tout pour nous d'acquérir du matériel d'expérience.

Cependant, de ces greffes se dégagent certains faits.

Le pourcentage de prises a été élevé, plus de 80 % des chiens inoculés sous la peau. Nous sommes en droit de le considérer comme le plus important de ceux obtenus jusqu'ici.

D'autre part, nous avons constaté peu de cas de régression (7,5 %). Suivant les auteurs qui ont étudié le sarcome de Sticker par la méthode des greffes les avis sont partagés. Pour certains la plupart des tumeurs après avoir crû et atteint un maximum, ont diminué de taille, puis disparu. Pour d'autres les tumeurs ont persisté dans leur majorité.

Nous pensons qu'il s'agit là d'une variation de « virulence ». Certaines souches seront virulentes, d'autres non.

Ceci se reflète dans l'apparition des métastases dont nous avons observé un certain nombre de cas (6).

Cependant les métastases ne s'établissent pas avec le temps comme pour la plupart des cancers : ou bien en 4 à 5 mois après la greffe, la tumeur obtenue donne des métastases, ou bien elle reste localisée.

Nous avons observé des métastases cutanées d'un type particulier qui existent d'ailleurs dans la maladie naturelle. Il s'agit de petits nodules dermiques qui, après ulcération, se creusent en cratère en leur centre sans augmenter de taille et qui peuvent rapidement atteindre un nombre considérable.

A leur tour, ces nodules ont pu être transmis par greffe sur 4 passages.

Tumeurs spontanées ou greffes localisées ou métastases de greffes conservent la même « virulence ».

***

Cette tumeur propre au Chien a pu être transmise au Chacal **Canis aureus.** Notre matériel animal a évidemment été moins important que dans le cas du Chien. Cependant, on peut constater que la tumeur prend presque à tous coups (11 sur 12) et aussi que la proportion de métastases est plus élevée que chez le Chien, mais avec le même caractère d'apparition précoce.

Tumeur naturelle ou tumeur de souche passent du Chien au Chacal et vice-versa.

L'impression qui se dégage de ces expériences est que sur un terrain neuf la « virulence » de la tumeur est augmentée.

***

Greffée chez de petits animaux (Rat, Souris, Lapin, Cobaye) selon la méthode de Greene, cette tumeur ne nous a donné que des résultats décevants.

Seul, le Hamster conditionné selon la méthode de Toolan se révèle réceptif (20 animaux positifs sur 33 inoculés).

Dans le cas des greffes de Greene, nous ne pensons pas que la technique utilisée soit à incriminer, les greffes intra-oculaires et intra-cérébrales ayant été en grande partie positives pour la tumeur-ascite d'Ehrlich témoin. Dans ce genre de greffe, il s'agit en fait d'une culture tissulaire d'un type particulier. L'humeur aqueuse ne convient pas aux cellules du sarcome de Sticker.

***

2° **Culture « in vitro »**

Nous avons étudié cette tumeur « in vitro » soit par la méthode des explants sur plasma de poulet, soit par la méthode de Maitland, soit enfin par la trypsination.

Avec la première de ces méthodes, les résultats ont été d'emblée positifs et le sont toujours restés.

La méthode de Maitland a été décevante.

Nous avons éprouvé beaucoup de difficultés en trypsinant nos cellules. Ce n'est qu'à partir du moment où nous avons trouvé un milieu favorable que nous avons pu créer une lignée continue, entretenue régulièrement depuis plus de 3 ans (souche 503, 180 passages en janvier 1965).

A ces différences de croissance entre méthode des explants et méthode de trypsination s'ajoutent des différences morphologiques. Avec la méthode des explants les cellules se développent avec une allure fibroblastique. Avec la seconde elles sont étalées et de type histiocytaire.

En fait, nous avons montré expérimentalement qu'il s'agit des mêmes cellules qui se développent et que seule la différence de substratum doit être mise en cause.

Il n'existe pas de différences morphologiques entre les cellules provenant des tumeurs naturelles ou des tumeurs greffées. De toutes façons, il s'agit bien des cellules de la tumeur qui croissent et se multiplient.

Dans les cellules en culture il n'existe pas d'inclusions de type viral, mais dans la zone intermédiaire du cytoplasme on voit des grains PAS+, pyroninophiles, non métachromatiques, dont nous ne connaissons pas la signification exacte.

Ces cellules soit en première explantation, soit en lignée continue, possèdent de remarquables propriétés d'athrocytose et de phagocytose. Nous estimons que l'on peut leur attribuer « l'état histiocytaire ».

Bien plus, la souche 503 que nous avons créée peut, du fait de son caractère histiocytaire, être susceptible de nombreuses applications pratiques en parasitologie expérimentale car elle présente une bonne aptitude à la culture « in vitro » de certains parasites intracellulaires tels que **Toxoplasma gondii**, diverses **Leishmanies** et **Trypanosoma cruzi.**

***

Nous pensons que des propriétés physiologiques conservées « in vitro » sont un argument supplémentaire pour nous permettre, en plus des caractères histo-pathologiques, de classer cette tumeur transmissible vénérienne dans le groupe des tumeurs d'origine réticulo-histiocytaire et, compte tenu de la propriété de donner des métastases, d'en faire un RETICULO-HISTIOCYTO-SARCOME.

DEUXIEME PARTIE

Notre hypothèse de départ était que cette tumeur contagieuse vénérienne était causée par un agent oncogène.

Nous avons tenté de mettre cet agent en évidence par différents moyens.

1° Inoculation des cultures cellulaires

En supposant que les cellules hébergeaient un agent oncogène, on pouvait espérer que ce virus serait révélé par la culture des cellules tumorales « in vitro » (cas du SV 40). C'est pourquoi nous avons cherché longuement à cultiver ces cellules.

L'inoculation des cultures cellulaires aux Rongeurs et au Chacal par différentes voies a été négative.

L'inoculation au Chien a été positive mais seulement dans le cas de la muqueuse de la verge et du vagin.

Les résultats n'ont pas été les mêmes chez tous les chiens et avec toutes les cellules.

On distingue plusieurs stades en dehors des cas négatifs :

— Formation régulière d'une papule au point d'inoculation qui est transitoire et disparaît.

— Formation à distance sur le base de la verge, le fourreau et le vagin, de granulations, d'abord translucides, puis rouges et saignant facilement.

— Dans un stade ultérieur, ces granulations peuvent donner de petits polypes ou il y a, à plus grande distance, formation de tumeurs volumineuses.

Les passages éloignés de notre souche 503 ne nous ont donné que les premiers stades de la maladie : granulations et petits polypes. Ayant alors quitté le territoire algérien nous n'avons pu suivre le devenir de ces animaux

Les passages rapprochés de la souche 579 (5e et 6e) ont donné, en plus de ces granulations, des tumeurs à distance dont une a été greffée avec succès sur d'autres chiens.

On peut objecter que ce sont les cellules inoculées qui se sont développées pour leur propre compte. Or, d'une part, les effets résultants de l'inoculation : système granulations-polypes ou granulations-tumeurs ont toujours lieu à distance du point d'inoculation, d'autre part, les coupes histologiques faites après l'inoculation nous montrent la nécrose ou la disparition du matériel injecté.

Nous sommes fondé à penser que les cellules inoculées meurent et que les polypes apparaissent par induction des cellules réticulaires des îlots lymphoïdes présents normalement dans la muqueuse pénienne.

L'hyperplasie que nous avons vue porte surtout sur les éléments réticulaires. S'agit-il d'une simple hyperplasie ou du tout début de la formation de la tumeur de Sticker ? Les élément réticulaires au début n'ont pas de caractères tumoraux particuliers, mais leur importance, leur tassement, leur aspect histiocytaire sont très évocateurs du sarcome de Sticker. Un des polypes étudié sur frottis nous a donné l'image du sarcome de Sticker.

Nous pensons donc pouvoir dire que c'est dans ces îlots lymphoïdes qu'il faut chercher l'histogénèse de cette tumeur.

2° Les chromosomes du sarcome de Sticker

Nous avons étudié la formule chromosomique des cellules somatiques du Chien normal cultivées « in vitro ». Nous avons observé des différences touchant à l'euploïdie et à l'aneuplodie suivant que l'on s'adresse au chien nouveau-né ou au chien sub-adulte.

Dans le premier cas, on observe 75 % de cellules diploïdes et 25 % de cellules aneuploïdes réparties sur un faible intervalle de variation, dans le second 37 % de cellules diploïdes et un intervalle de variation élevé.

Nous constatons cette aneuploïdie massive sans trop savoir comment l'expliquer. Chez l'homme, par exemple, l'aneuploïdie croît avec l'âge, mais dans des proportions infiniment moins grandes.

L'étude de la formule chromosomique des tumeurs de Sticker greffées chez le Chien, cultivées « in vitro » en première explantation, nous a conduit au résultat suivant :

Une tumeur greffée chez un chien mâle a le caryotype mâle, greffée sur un chien femelle, le caryotype femelle, quel que soit le sexe du donneur de la tumeur.

Le caryotype de ces tumeurs se calque sur celui des cellules somatiques du chien adulte avec le même caractère d'aneuploïdie (les tumeurs avaient été greffées sur des chiens d'âge comparable aux témoins).

Le gonosome X, seul chromosome médiocentrique du Chien, joue incontestablement le rôle de chromosome marqueur.

Nous sommes en contradiction avec les travaux du Japonais MAKINO qui a constaté dans les mitoses des cellules que l'on trouve dans le liquide qui stagne dans les infractuosités des tumeurs naturelles un mode à 57 chromosomes avec un grand nombre de gonosomes X (17) et qui considère le sarcome de Sticker comme une « stem-line ».

Nous pensons pouvoir expliquer ces différences de résultats par la différence du matériel d'étude : tumeur naturelle dans un cas, tumeur greffée ou provoquée à partir d'inoculation de cultures cellulaires dans l'autre.

***

L'étude du caryotype des cellules cultivées sur une longue période de temps en lignée continue nous a montré — comme dans un grand nombre d'autres souches — des anomalies et une tendance à l'hyperploïdie avec un accroissement du nombre des gonosomes X, mais cet accroissement se fait suivant une fonction linéaire du nombre des chromosomes.

***

Enfin, nous avons constaté que sur les tumeurs spontanées ou greffées chez les chiens femelles on voit « in vitro » dans 30 à 40 % des cellules le corpuscule de Barr, alors qu'on ne le voit pratiquement pas chez les mâles. Dans les cultures témoins les chiffres sont équivalents.

L'étude du caryotype et de la chromatine sexuelle des tumeurs greffées nous montre que ces tumeurs possèdent un sexe, celui de l'animal porteur et non celui de l'animal donneur de la greffe.

La signature du sexe nous permet d'affirmer que les cellules de la tumeur « greffée » ne sont pas les descendantes des cellules inoculées.

Il y a 60 ans, les Anglais BASHFORD, MURRAY et CRAMER avaient signalé que le matériel inoculé lors de la greffe se nécrosait et disparaissait et que les tumeurs néoformées provenaient des cellules du tissu conjonctif de l'hôte.

Nous pensons également qu'il y a disparition des cellules inoculées avec libération d'un « quelque chose » qui va induire les cellules réticulaires de l'hôte et provoquer une nouvelle tumeur.

3° **La transmission a-cellulaire**

La première idée qui vient à l'esprit quand on veut prouver la présence

d'un virus oncogène dans une tumeur, est la démonstration directe par inoculation de l'extrait filtré de la tumeur sur l'animal de même espèce.

Nous avons cherché à reproduire la tumeur de Sticker par inoculation au Chien de filtrats ou de surnageants de centrifugation de broyat tumoral.

Les résultats ont été négatifs.

Le même matériel n'a pas provoqué de lésions cytopathogènes sur des cultures cellulaires, de tumeurs chez la Souris, de passages en série chez l'œuf embryonné.

A l'heure actuelle l'inoculation au nouveau-né a donné de beaux résultats dans l'étude de nombreux virus oncogènes tels que ceux des leucémies murines et du polyome.

Nous avons utilisé vainement plusieurs séries de chiots âgés de 24 heures.

Faut-il conclure qu'il n'y a pas d'agent oncogène dans cette tumeur ?

Or, un filtrat de tumeur ayant été inoculé à des cellules de la rate d'un chien cultivées « in vitro », ces cellules récoltées au bout de quelques jours et réinoculées au chien donneur de la rate ont reproduit une tumeur donnant l'image d'un réticulo-sarcome.

Nous pensons que nos échecs proviennent d'une erreur de technique. Nous avons utilisé des filtrats ou des surnageants de centrifugation congelés un certain temps à — 27 °C. Le seul résultat que nous ayons obtenu l'a été quand, à partir d'une tumeur congelée, nous avons fait le broyat et le filtrat et l'inoculation dans la même journée. Il y a là un problème de conservation qui est très important.

***

D'autre part, l'inoculation au Chien de l'acide ribonucléique extrait par la méthode au phénol d'une tumeur fraîchement prélevée a reproduit une tumeur elle-même transmissible par greffe classique. Il existe donc dans cette tumeur un acide nucléique transformant et la reproduction à l'aide de matériel a-cellulaire est possible.

Mais, de même que dans les cas précédents, le résultat obtenu l'a été seulement quand dans la même journée nous avons fait l'exérèse de la tumeur, l'extraction de l'acide nucléique et l'inoculation au Chien.

***

L'ensemble de ces trois groupes de faits : inoculation au Chien des cultures cellulaires et de l'acide ribonucléique extrait de la tumeur, sexualité des tumeurs nous amène à penser que le sarcome de Sticker est causé par un agent présent dans les cellules.

Les difficultés que nous avons rencontrées dans l'étude des filtrats ou des acides nucléiques nous font considérer que cet agent doit être fragile et de conservation délicate.

TROISIEME PARTIE

Certains aspects cliniques et biologiques du sarcome de Sticker nous

L'étude de la formule chromosomique des tumeurs de Sticker greffées chez le Chien, cultivées « in vitro » en première explantation, nous a conduit au résultat suivant :

Une tumeur greffée chez un chien mâle a le caryotype mâle, greffée sur un chien femelle, le caryotype femelle, quel que soit le sexe du donneur de la tumeur.

Le caryotype de ces tumeurs se calque sur celui des cellules somatiques du chien adulte avec le même caractère d'aneuploïdie (les tumeurs avaient été greffées sur des chiens d'âge comparable aux témoins).

Le gonosome X, seul chromosome médiocentrique du Chien, joue incontestablement le rôle de chromosome marqueur.

Nous sommes en contradiction avec les travaux du Japonais MAKINO qui a constaté dans les mitoses des cellules que l'on trouve dans le liquide qui stagne dans les infractuosités des tumeurs naturelles un mode à 57 chromosomes avec un grand nombre de gonosomes X (17) et qui considère le sarcome de Sticker comme une « stem-line ».

Nous pensons pouvoir expliquer ces différences de résultats par la différence du matériel d'étude : tumeur naturelle dans un cas, tumeur greffée ou provoquée à partir d'inoculation de cultures cellulaires dans l'autre.

⁂

L'étude du caryotype des cellules cultivées sur une longue période de temps en lignée continue nous a montré — comme dans un grand nombre d'autres souches — des anomalies et une tendance à l'hyperploïdie avec un accroissement du nombre des gonosomes X, mais cet accroissement se fait suivant une fonction linéaire du nombre des chromosomes.

⁂

Enfin, nous avons constaté que sur les tumeurs spontanées ou greffées chez les chiens femelles on voit « in vitro » dans 30 à 40 % des cellules le corpuscule de Barr, alors qu'on ne le voit pratiquement pas chez les mâles. Dans les cultures témoins les chiffres sont équivalents.

L'étude du caryotype et de la chromatine sexuelle des tumeurs greffées nous montre que ces tumeurs possèdent un sexe, celui de l'animal porteur et non celui de l'animal donneur de la greffe.

La signature du sexe nous permet d'affirmer que les cellules de la tumeur « greffée » ne sont pas les descendantes des cellules inoculées.

Il y a 60 ans, les Anglais BASHFORD, MURRAY et CRAMER avaient signalé que le matériel inoculé lors de la greffe se nécrosait et disparaissait et que les tumeurs néoformées provenaient des cellules du tissu conjonctif de l'hôte.

Nous pensons également qu'il y a disparition des cellules inoculées avec libération d'un « quelque chose » qui va induire les cellules réticulaires de l'hôte et provoquer une nouvelle tumeur.

3° **La transmission a-cellulaire**

La première idée qui vient à l'esprit quand on veut prouver la présence

d'un virus oncogène dans une tumeur, est la démonstration directe par inoculation de l'extrait filtré de la tumeur sur l'animal de même espèce.

Nous avons cherché à reproduire la tumeur de Sticker par inoculation au Chien de filtrats ou de surnageants de centrifugation de broyat tumoral.

Les résultats ont été négatifs.

Le même matériel n'a pas provoqué de lésions cytopathogènes sur des cultures cellulaires, de tumeurs chez la Souris, de passages en série chez l'œuf embryonné.

A l'heure actuelle l'inoculation au nouveau-né a donné de beaux résultats dans l'étude de nombreux virus oncogènes tels que ceux des leucémies murines et du polyome.

Nous avons utilisé vainement plusieurs séries de chiots âgés de 24 heures.

Faut-il conclure qu'il n'y a pas d'agent oncogène dans cette tumeur ?

Or, un filtrat de tumeur ayant été inoculé à des cellules de la rate d'un chien cultivées « in vitro », ces cellules récoltées au bout de quelques jours et réinoculées au chien donneur de la rate ont reproduit une tumeur donnant l'image d'un réticulo-sarcome.

Nous pensons que nos échecs proviennent d'une erreur de technique. Nous avons utilisé des filtrats ou des surnageants de centrifugation congelés un certain temps à — 27 °C. Le seul résultat que nous ayons obtenu l'a été quand, à partir d'une tumeur congelée, nous avons fait le broyat et le filtrat et l'inoculation dans la même journée. Il y a là un problème de conservation qui est très important.

⁂

D'autre part, l'inoculation au Chien de l'acide ribonucléique extrait par la méthode au phénol d'une tumeur fraîchement prélevée a reproduit une tumeur elle-même transmissible par greffe classique. Il existe donc dans cette tumeur un acide nucléique transformant et la reproduction à l'aide de matériel a-cellulaire est possible.

Mais, de même que dans les cas précédents, le résultat obtenu l'a été seulement quand dans la même journée nous avons fait l'exérèse de la tumeur, l'extraction de l'acide nucléique et l'inoculation au Chien.

⁂

L'ensemble de ces trois groupes de faits : inoculation au Chien des cultures cellulaires et de l'acide ribonucléique extrait de la tumeur, sexualité des tumeurs nous amène à penser que le sarcome de Sticker est causé par un agent présent dans les cellules.

Les difficultés que nous avons rencontrées dans l'étude des filtrats ou des acides nucléiques nous font considérer que cet agent doit être fragile et de conservation délicate.

TROISIEME PARTIE

Certains aspects cliniques et biologiques du sarcome de Sticker nous

ont amené à étudier d'autres sarcomes du Chien voisins de cette tumeur et à chercher les relations qui existent entre eux.

1° **Le réticulo-sarcome cutané du Chien**

L'étude d'une autre tumeur du système réticulo-histiocytaire du Chien, le RETICULO-SARCOME CUTANE, bien que faite sur une moins grande échelle nous a montré des différences de comportement.

Cette tumeur mal connue est à notre avis au moins aussi fréquente que le sarcome de Sticker en Algérie.

Cliniquement elle a son origine en un point quelconque de la peau et peut soit rester localisée, soit donner des métastases cutanées nodulaires d'un type particulier.

A notre avis, cette tumeur est peu radio-sensible et difficilement transmissible par greffe au contraire du sarcome de Sticker. Nous n'avons réussi à la reproduire par greffe que sur des chiots irradiés.

Au point de vue histopathologique, il n'existe pas de différences sensibles avec le sarcome de Sticker bien que sur les coupes histologiques des tumeurs on rencontre des inclusions cytoplasmiques de type viral.

Les cultures cellulaires ont le même aspect que celles du sarcome de Sticker.

L'inoculation de filtrats au Chien a été négative, cependant nous avons obtenu des embryo-cultures virulentes.

Ces derniers faits : inclusions cytoplasmiques et embryo-cultures virulentes pourraient nous inciter à émettre l'hypothèse que cette tumeur peut être d'origine virale.

Enfin, cette tumeur rejoint le sarcome de Sticker dans l'aptitude à donner des métastases cutanées de type particulier.

Certains ont assimilé cette tumeur à une forme aberrante du sarcome de Sticker. Au point de vue biologique cette tumeur présente des points de rapprochements et des différences avec le sarcome de Sticker. C'est pourquoi nous pensons que l'on doit en faire une entité à part au moins pour le moment.

2° **Le mastocytome**

Une autre tumeur du Chien, quoique bien définie et individualisée, le MASTOCYTOME, donne aussi des métastases cutanées d'un type spécial nodulaire. Les Américains LOMBARD et MOLONEY ont transmis cette tumeur par greffe et l'ont reproduite par filtrat.

3 **Le syndrome des hématodermies nodulaires malignes du Chien**

Nous constatons que ces trois tumeurs : sarcome de Sticker, réticulosarcome cutané et mastocytome qui entrent dans le cadre des tumeurs dérivées du système réticulo-histiocytaire finissent par donner des métastases multiples localisées à la peau sous forme de petits nodules dermiques.

Le caractère brutal d'apparition de ces nodules, leur forme identique, l'issue fatale sont communs aux trois tumeurs.

Nous avons donné à cette image clinique le nom de SYNDROME DES HEMATODERMIES NODULAIRES MALIGNES DU CHIEN.

Nous pensons de plus que ces trois tumeurs sont en rapport avec une étiologie virale. S'agit-il d'un même virus ou de virus différents : c'est là le problème que nous posons.

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons entrepris un travail expérimental sur le sarcome de « STICKER », tumeur contagieuse et vénérienne du Chien, avec l'intention, d'une part, de préciser la nature histologique de cette tumeur, d'autre part, de démontrer son origine virale.

Nous avons appliqué les méthodes d'étude suivantes :

— Greffes homologues et hétérologues ;

— Cultures cellulaires et recherches des chromosomes ;

— Inoculations a-cellulaires.

Sur une moins grande échelle ces méthodes ont été appliquées à l'étude d'une autre tumeur du Chien qui présente certains points communs avec le sarcome de Sticker, le RETICULO-SARCOME CUTANE.

Résultats obtenus

1° Nous avons établi trois souches de tumeurs greffées chez le Chien par la méthode classique. Sous la peau l'inoculation a été positive dans 96 cas sur 117 et sous le péritoine dans 11 cas sur 19. Une des souches a été maintenue sur 19 passages.

Ces tumeurs greffées, ou donnent des métastases dans un laps de temps assez court, 4 à 5 mois, ou restent localisées.

Les métastases cutanées ont été transmises par greffe.

2° Chez le Chacal la greffe de la tumeur de Sticker prend presque à tous coups (11 sur 12). La proportion de métastases y est plus élevée que chez le Chien, mais avec le même caractère d'apparition précoce.

3° Nous avons transmis cette tumeur au Hamster conditionné par la cortisone (20 sur 33 inoculés).

4° La tumeur a été étudiée « in vitro » suivant diverses méthodes. La forme des cellules varie suivant les techniques. Nous avons montré que dans tous les cas, il s'agit des mêmes cellules tumorales qui se développent.

5° Nous avons établi à partir de ces cellules une lignée continue, la souche 503 qui a été entretenue depuis 3 ans et demi sur plus de 180 passages.

6° Les caractères de nutrition, d'athrocytose et de phagocytose nous font considérer que les cellules du sarcome de Sticker possèdent « in vitro » « l'état histiocytaire ».

7° La souche 503, du fait de son caractère histiocytaire, a été appliquée à la culture « in vitro » de divers Protistes parasites intracellulaires : **Toxoplasma gondii, Leishmania donovani, tropica** et **enrietti, Trypanosoma cruzi.**

8° Nous estimons que ces propriétés physiologiques conservées « in vitro » sont un argument supplémentaire pour permettre, en plus des caractères histo-pathologiques et de la faculté de donner des métastases à l'état naturel ou greffé, de considérer cette tumeur comme un réticulo-histiocytosarcome.

9° L'inoculation des cultures cellulaires sous la muqueuse de la verge et du vagin du Chien nous a donné les résultats suivants : au point d'inoculation les cellules disparaissent. A une certaine distance se développent à partir de formations lymphoïdes des granulations et de petits polypes et à distance éloignée des tumeurs plus volumineuses que nous avons pu transmettre par greffe chez le Chien.

L'étude du processus nous permet de considérer que l'histogénèse de la tumeur se fait par induction des minuscules ilôts lymphoïdes présents normalement dans la muqueuse de la verge.

10° L'étude de la formule chromosomique des tumeurs greffées cultivées « in vitro » en première explantation nous a montré qu'une tumeur greffée possède le caryotype de l'animal porteur de la tumeur.

Le gonosome X seul chromosome médiocentrique du Chien joue le rôle de chromosome marqueur.

11° Les cellules de souche ont un caryotype qui évolue suivant les lignées dans le sens tri- ou hypotétraploïde avec augmentation du nombre de gonosomes. Il existe une relation linéaire entre le nombre de gonosomes X et le nombre de chromosomes des cellules.

12° Chez les chiens femelles porteurs de tumeurs naturelles ou greffées on voit « in vitro » dans la même proportion que chez les témoins le corpuscule de Barr. On ne le voit pratiquement pas chez les tumeurs portées par des chiens mâles.

13° Caryotype et chromatine sexuelle des tumeurs greffées nous indiquent que ces tumeurs possèdent un sexe, celui de l'animal porteur et non celui de l'animal donneur de la greffe. Les cellules de ces tumeurs ne sont donc pas les descendantes des cellules inoculées.

14° D'une manière générale l'inoculation de filtrats ou de surnageants de centrifugation sur divers matériels n'a pas donné de résultats. Cependant un filtrat de tumeur ayant été inoculé à des cellules de la rate d'un chien cultivées « in vitro », ces cellules récoltées au bout de quelques jours et réinoculées au chien donneur de la rate ont reproduit un réticulo-sarcome.

15° L'inoculation au Chien de l'acide ribonucléique extrait d'une tumeur par la méthode au phénol a reproduit une tumeur de Sticker elle-même transmissible par greffe ensuite.

16° L'ensemble de ces résultats expérimentaux : inoculation au Chien des cultures cellulaires, de cellules inoculées elles-mêmes par filtrat de tumeur, de l'acide ribonucléique et enfin la sexualité des tumeurs nous amène à

conclure que le sarcome de Sticker est causé par un agent oncogène présent dans les cellules tumorales. Nous pensons que cet agent est fragile et de conservation délicate.

17° L'étude du réticulo-sarcome cutané du Chien au point de vue clinique et expérimental nous montre que cette tumeur, au contraire du sarcome de Sticker, est peu radiosensible et n'a pu être transmise par greffe que sur des chiots irradiés.

18° Peu différent du sarcome de Sticker au point de vue histopathologique, ce sarcome présente presque toujours des inclusions intracytoplasmiques de type viral.

19° « In vitro » cette tumeur a les mêmes caractères que le sarcome de Sticker.

20° Nous avons obtenu dans l'œuf de poule embryonné des cultures ultra-virulentes à partir de cette tumeur.

21° Bien que certains aient assimilé ce sarcome à une forme aberrante du sarcome de Sticker, nous estimons qu'au point de vue nosologique on doit considérer, au moins pour le moment, le réticulo-sarcome cutané du Chien comme une entité à part.

22° Nous avons étudié une forme clinique commune au sarcome de Sticker naturel ou greffé, au réticulo-sarcome cutané et au mastocytome du Chien, tumeurs dérivées du système réticulo-histiocytaire. Il s'agit de l'apparition brutale de multiples petits nodules cutanés, intradermiques, de forme discoïdale, s'ulcérant en leur centre. Nous avons donné à cet aspect le nom de syndrome des hématodermies nodulaires malignes du Chien. Nous émettons l'hypothèse de l'origine virale de ce syndrome.

BIBLIOGRAPHIE

AGNESE (M.O.) : Nota sôbra o tumor venereo contagioso de câo. *Rev. Brasil. Biol.* 1949, *9*, 161-162.

AJELLO (P.) : Una nuova forma di localizzazioni extragenitali del Sarcoma di Sticker (prove positive di trapianto). *Clinica veterinaria* 1936, *59*, 147-164.

AJELLO (P.) : Osservazione sul tumori genitale contagioso del cane. *Nuovo ercolani* 1939, *44*, 201-208.

AJELLO (P.) : Il cosidetto sarcoma di Sticker in sede extragenitale. *Nuova vet.* 1949, *25*, 333-337 et 405-410.

AJELLO (P.) : Primi risultati di colture in « tubi rolanti » tel tumore di Sticker. *Arch. Vet. Ital.* 1956, *7*, 411-420.

AJELLO (P.) : Indazini sulla granulopessia degli elementi cellulari del tumore di Sticker in colorazione sopravitale. *Arch. Vet. Ital.* 1956, *7*, 1-4.

AJELLO (P.) : Sulla presenza di inclusioni nelle cellule del tumore di Sticker. *Boll. Soc. ital. Biol. spe.* 1961, *37*, 247-248.

AJELLO (P.) et GIMBO (A.) : Influenza della ribonucleasi sulla transmissibilita del tumore di Sticker. *Atti. Soc. ital. Sci. vet.* 1962, *16*, part. 2, 155-156.

ALBRINK (W.S.) et WALLACE (A.C.) : A comparison of growth potentialities of human tumors in tissue culture and in heterologous transplantation. *Cancer Res.* 1953, *13*, 174-177.

ALLAM (M.W.), LOMBARD (L.S.), STUBBS (E.L.) et SHIRER (J.F.) : Transplantation of a thyroid carcinoma within the canine species. *Cancer Res.* 1954, *14*, 734-737.

ALLAM (M.W.), LOMBARD (L.S.), STUBBS (E.L.) et SHIRER (J.F.) : Transplantability of a canine thyroid carcinoma through thirty generations in mixed-breed puppies. *J. Nat. Cancer Inst.* 1956, *17*, 123-129.

ANDRAL (L.) : Quatre cas de sarcome de Sticker observés en Ethiopie. *Bul. Soc. Path. exot.* 1956, *49*, 1125-1126.

ANDRUS (S.B.), MEISSNER (G.F.) et WHORTON (C.M.) : Heterologous transplantation of human neoplasm including lymphomas. *Cancer* 1951, *4*, 1014-1024.

ANTOINE, LIEGEOIS et VERSTRAETE : Contribution à l'étude des tumeurs chez le Chien. *Bul. Ac. roy. Med. Belg.* 1934, *14*, 301-319.

ARBEITER (K.) : Der Scheidentumor bei der Hündin und seine operative Behandlung. *Wien. Tierärtzt. Mschr.* 1961, *48*, 750-755.

ARVY (L.) : Les labrocytes (Mastzellen). *Revue d'hémat.* 1955, *10*, 55-94.

AWA (A.), SASAKI (M.) et TAKAYAMA (M.) : An in vitro study of the somatic chromosomes in several mammals. *Jap. J. Zool.* 1959, *12*, 257-265.

BALDUCCI (D.) et TYRREL (D.) : Quantitatives studies of *Toxoplasma gondii* in cultures of trypsin-dispersed mammalian cells. *Brit. J. Exp. Path.* 1956, *37*, 168-175.

BALL (V.) et ROSSI (P.) : Cancer du fourreau et de la verge avec métastase ganglionnaire chez un chien. *Revue vét.* 1928, *80*, 375-380.

BARR (M.L.) et BERTRAM (E.G.) : A morphological distinction between neurones of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 1949, *163*, 676-677.

BARRON (C.N.), SAUNDERS (L.Z.), SEIBOLD (H.R.) et HEATH (M.K.) : Intraocular tumors in Animals. V. Transmissible venereal tumor of the dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1963, *24*, 1263-1270.

BASHFORD (E.F.), MURRAY (J.A.) et CRAMER (W.) : Comparison between the transmission of an infective granuloma of the dog and carcinoma of the mouse. *Scient. Rep. Invest. Imp. Cancer Res. Found.* 1905, *2*, 33-37.

BAYREUTHER (K.) : Chromosomes in primary neoplastic growth. *Nature* 1960, *186*, 6-9.

BEAUQUIER (C.) : Le sarcome de Sticker du Chien. *Thèse vét.* Lyon, 1961.

BEEBE (S.P.) : The growth of lymphosarcoma in dogs. *J. Am. Med. Ass.* 1907, *49*, 1492-1493.

BEEBE (S.P.) et EWING (J.) : A study of the so-called infectious lymphosarcoma of dogs. *J. Med. Res.* 1906, *15*, 209-227.

BEEBE (S.P.) et TRACY (M.) : The treatment of experimental tumors with bacterial toxins. *J. Am. Med. Ass.* 1907, *49*, 1493-1498.

BENOIT (J.) et PUGET (E.) : L'anesthésie tronculaire de certains nerfs génitaux chez la chienne et le chien. *Rev. Med. Vét.* 1946, *97*, 471.

BERGELL (P.) et STICKER (A.) : Ueber Pathogenese und über den spezifischen Abbau der Krebsgeschwülsten. *Deut. Med. Wochenschr.* 1907, *2*,1521-1522.

BEVERWIJK (A. van) : Züchtung von Walker-Rattenkarzinom n° 256 « in vitro ». *Arch. exper. Zellforsch.* 1934, *16*, 151-158.

BLOOM (F.) : Spontaneous solitary and multiple mastcell tumors (« mastocytoma ») in dogs. *Arch. Path.* 1942, *33*, 661-676.

BLOOM (F.) : Effect of cortisone on mastcell tumors (mastocytoma) of the dog. *Proc. Soc Exp. Biol. Med.* 1952, *79*, 651-654.

BLOOM (F.), PAFF (G.H.) et NOBACK (C.R.) : The transmissible venereal tumor of the dog. Studies indicating that the tumor cells are mature end cells of reticulo-endothelial origin. *Am. J. Path.* 1951, *27*, 119-139.

BONADUCE (A.), AJELLO (P.) et COMPAGNUCCI (M.) : Alcune ricerche sul tumore di Sticker. *Zooprofilassi* 1960, *15*, 937-957.

BORREL (A.) : Lymphosarcome du Chien. *C.R. Acad. Sci.* 1907, *144*, 344-345.

BOVERI (T.H.) : Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Iena. Gustav Fischer, 1914.

CADEILLAN (J.) : Contribution à l'étude des tumeurs vénériennes du Chien (Thérapeutique). *Thèse vét.* Toulouse, 1953.

CAJAL (N.) et CEPLEANU (M.) : Virus isolé à partir d'un cas de réticulo-sarcome cutané humain. *Rev. Sci. Med. Rouman.* 1961, *6*, 17-20.

CARREL (A.) : La malignité des cultures pures de monocytes du sarcome de Rous. *C.R. Soc. Biol.* 1924, *91*, 1067-1069.

CARREL (A.) et EBELING (A.H.) : The fundamental properties of the fibroblasts and macrophages. III. The malignant fibroblasts of sarcoma 10 of the Crocker Foundation. *J. Exp. Med.* 1928, *48*, 105-124. IV. The malignant fibroblast of Jensen sarcoma. *id.* 1928, *48*, 285-298.

CHELI (R.) : Contributo alla conoscenza dei tumori del sistema reticoloistiocitario negli animali domestici. *Nuova vet.* 1960, *36*, 94-102.

CHERNIN (E.) et WELLER (T.H.) : Serial propagation of *Toxoplasma gondii* in roller tube cultures of mouse and of human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954, *85*, 68-72.

CHOUROULINKOV (L.), FEBVRE (H.) et OBERLING (C.) : La tumeur GRCH/15 en culture de tissus et sa réinoculation à l'animal. *Bul. Ass. Fr. Et. Cancer* 1958, *45*, 417-433.

COOK (M.K.) et JACOBS (L.) : Cultivation of *Toxoplasma gondii* in tissue cultures of various derivations. *J. Parasit.* 1958, *44*, 172-182.

CORREIA MADEIRA (A.) : Natureza histologica do sarcoma de Sticker. *Rev. Med. Vet.* Lisboa 1948, *43*, 229-237.

CRETZEANU (C.), PASTEA (Z.) et MAY (I.) : Observation sur un cas de réticulomatose cutanée chez une chienne. *Rec. Méd. vét.* 1958, *134*, 543-557.

CRILE (G.W.) et BEEBE (S.P.) : Transfusion of blood in the transplantable lymphosarcoma of dogs. *J. Med. Res.* 1908, *18*, 385-405.

DANIEL (P.) et DROZ (B.) : Comportement des cellules animales « in vitro » à la température de 4° C. *Ann. Ins. Past.* 1960, *98*, 416-428.

DAWE (C.J.), POTTER (M.) et LEIGHTON (J.) : Progression of a reticulum-cell sarcoma of the mouse « in vivo » and « in vitro ». *J. Nat. Canc. Inst.* 1958, *21*, 753-768.

DEMONBREUN (W.A.) et GOODPASTURE (E.W.) : An experimental investigation concerning the nature of contagious lymphosarcoma of dogs. *Am. J. Cancer* 1934, *21*, 295-321.

DERBAL (Z.) et DAUDEL (R.) : Traitement chirurgical des tumeurs vénériennes de la chienne. *Rec. Méd. Vét.* 1952, *128*, 26-29.

DOZZA (G.) et TORLONE (V.) : Riproduzione sperimentale del tumore di Sticker con cellule tripsinizzate e con frazioni cellulari. *Vet. Ital.* 1960, *11*, 647-658.

DRIEUX (H.) : Une tumeur d'avenir : le sarcome vénérien infectieux du Chien. *Rev. Path. Comp. Hyg. Gén.* 1945, *45*, 97-101.

DRIEUX (H.), GLAUNES (P.) et THIERY (G.) : Histologie comparée des réticulopathies. *Rev. Path. Comp. Hyg. Gén.* 1953, *53*, 337-388.

DULBECCO (R.) et VOGT (M.) : Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus. *J. Exp. med.* 1954, *99*, 167-182.

DUNGERN Van : Zur Biologie des Rundzellensarkoms des Hundes. *München. med. Wochenschr.* 1912, *1*. 238-239.

DUNN (T.B.) et POTTER (M.) : A transplantable mastcell neoplasm in the mouse. *J. Nat. Cancer Inst.* 1957, *18*, 587-601.

DUNSTAN (J.) : Infective venereal tumours in dogs. *J. Comp. Path. Ther.* 1904, *17*, 358-359.

DUPLAY (S.) et CAZIN (M.) : Tumeurs expérimentales chez les animaux. *Atti d. xi Cong. med. internaz.* Roma 1894, *2*, 103-104.

EAGLE (H.) : Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1955, *89*, 362-364.

EICHENWALD (H.F.) : The laboratory diagnosis of toxoplasmosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1956, *64*, 207-214.

EVANS (V.J.), HAWKINS (N.M.), WESTFALL (B.B.) et EARLE (W.R.) : Studies on culture lines derived from mouse liver parenchymatous cells grown in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 1958, *18*, 261-266.

FELDMAN (W.H.) : So-called infectious sarcoma of the dog in an unusual anatomic situation. *Am. J. Path.* 1929, *5*, 183-194.

FELDMAN (W.H.) : Neoplasms of domesticated animals. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1932, XX, 343-356.

FELDMAN-MUHSAM (B.) et HALBERSTRAEDER (L.) : The effect of X-Ray on *Leishmania tropica* « in vitro ». *Brit. J. Radiol.* 1946, *19*, 41-43.

FELL (H.B.) et ANDREWS (J.A.) : A cytological study of cultures « in vitro » of Jensen's rat sarcoma. *Brit. J. Exp. Path.* 1927, *8*, 413-428.

FERNANDES (M.V.) : The development of a human amnion strain of cells. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1958, *16*, 48-58.

FISCHER (A.) : Sur la culture indéfiniment prolongée, en dehors de l'organisme, de cellules provenant de tumeurs malignes. *C.R. Soc. Biol.* 1924, *90*, 1181-1184.

FISCHER (A.), FISCHER (M.) et HOLLMANN (A.) : Der gegenwärtige Zustand eines 6 Jahre alten Karzinomstammes in vitro. *Zeitschr. Krebsforsch.* 1933, *39*, 1-4.

FOLEY (G.E.) et DROLET (B.P.) : Sustained propagation of sarcoma 180 in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956, *92*, 347-352.

FOLEY (G.E.) et HANDLER (A.H.) : Differenciation of « normal » and neoplastic cells maintened in tissue culture by implantation into normal hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957, *94*, 661-664.

FORD (C.E.), HAMERTON (J.L.) et MOLE (R.H.) : Chromosomal changes in primary and transplanted reticular neoplasms of the mouse. *J. Cell Comp. Physiol.* 1958, *52*, suppl. 1, 235-269.

FRACCARO (M.) et LINDSTEIN (J.) : Observations on the so-called « sex-chromatin » in human somatic cells cultivated « in vitro ». *Exp. Cell Res.* 1959, *17*, 536-539.

FRIEDMAN (M.) et FOGH (J.) : Evaluation of malignancy in tumors produced in X-radiated and cortisone treated rats injected with human cells in continuous culture. *Cancer Res.* 1958, *18*, 879-886.

FROMENTIN (H.) : Entretien de *Trypanosoma gambiense* sur cultures de tissus. *Bul. Soc. Path. Exot.* 1961. *54*, 1046-1052.

FURTH (J.) et BREEDIS (C.) : Attempts at cultivation of viruses producing leukosis in fowls. *Arch. Path.* 1937, *24*, 281-302.

FURTH (J.), HAGEN (P.) et HIRSCH (E.) : Transplantable mastocytoma in the mouse containing histamine, heparin and 5-hydroxytryptamine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957, *95*, 824-828.

GALLEGO (A.) : Contribuccion a la histopatologia del llamado sarcoma genital del perro. *Arch. Espan. Oncol.* 1930, *1*, 201-213.

GAVRILOV (W.) et LAURENCIN (S.) : Application d'une méthode de culture de tissus à l'étude des Protozoaires. *Ann. Soc. belge Med. Trop.* 1938, *18*, 41-56.

GEISSLER : Gelungene Carcinom-uebertragung beim Hunde. *Verhandlung deutsch. Gesellsch. Chir.* 1895, *24*, 87-92.

GEY (G.O.), COFFMAN (W.D.) et KUBICEK (M.T.) : Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 1952, *12*, 264.

GLEASON (L.N.) : Infectious venereal granuloma in Greyhounds. *Vet. Med.* 1947, *42*, 299-301.

GOUAUD (F.) : Contribution à l'étude du sarcome de Sticker. Thérapeutique par les rayons X. *Thèse vét.* Toulouse, 1949.

GREENE (H.S.) : The use of the mouse eye in transplantation experiments. *Cancer Res.* 1947, *7*, 491-501.

GREENE (H.S.) : The transplantation of tumors to the brains of heterologous species. *Cancer Res.* 1951, *11*, 529-534.

GREENE (H.S.) : The significance of the heterologous transplantability of human cancer. *Cancer* 1952, *5*, 24-44.

GUERIN (L.F.) et KITCHEN (S.F.) : Adaptation of 6C3HED tumor cells to culture « in vitro ». *Cancer Res.* 1960, *20*, 344-346.

GUERIN (M.) : Corps d'inclusion dans les adéno-carcinomes mammaires de la souris. *Bul. Ass. Fr. Et. Cancer* 1955, *42*, 14-28.

GUERREAU (P.) : Tumeurs conjonctives des premières voies génitales dans l'espèce canine. *Thèse vét.* Paris, 1948.

GUIMARAES (F.N.) et MEYER (H.) : Cultivo de « Toxoplasma » (Nicolle e Manceaux 1905) en culturas de tecidos. *Rev. Brasil. Biol.* 1942, *2*, 123-129.

HANDEMER et BABLET : Lymphoblastome de la région inguinale chez un chien annamite. *Bul. Soc. Path. Exot.* 1927, *20*, 344-345.

HANDLER (A.H.) et FOLEY (G.E.) : Growth of human epidermoid carcinomas (strains KB et HeLa) in hamsters from tissue culture inocula. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956, *91*, 337-340.

HATAYA (M.), SHIRASU (Y.) et TAKEUCHI : Effects of X-Ray irradiation on the transmissible venereal tumor of the dog. *Gann* 1958, *49*, 307-319.

HATAYA (M.), USUI (K.) et SHIRASU (Y.) : Studies on the treatment of transmissible venereal tumor in the dog by X-Rays and γ-Rays irradiation. *Proc. XVIth Int. Vet. Congr.* Madrid 1959, *2*, 287-288.

HAUSCHKA (T.) : Correlation of chromosomal and physiologic changes in tumors. *J. Cell Comp. Physiol.* 1958, *52*, suppl. 1, 197-233.

HAWKING (F.) : Growth of Protozoa in tissue culture *V. Leishmania donovani*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1948, *41*, 545-554.

HAYFLICK (L.) et MOOREHEAD (P.S.) : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961, *25*, 585-621.

HEBRANT et ANTOINE : Deux cas de sarcome du fourreau chez le Chien. *Ann. Méd. Vét.* 1909, *58*, 133-138.

HENRY (A.) et BORY (L.) : Lymphosarcome de Sticker (sarcome infectieux et vénérien du Chien). *Bul. Soc. Fr. Dermato. Syph.* 1934, *41*, 1881-1883.

HILWIG (T.) : Entwicklung und Verhalten eines Rattensarkoms während 5 jähriger Züchtung in der Gewebekultur. *Zeitsch. Krebsforsch.* 1960, *63*, 222-231.

HISSARD (R.), MONCOURIER (L.) et JACQUET (J.) : Une nouvelle affection hématodermique : la mastocytose. *C.R. Acad. Sci.* 1950, *231*, 253-255.

HISSARD (R.), MONCOURIER (L.) et JACQUET (J.) : A propos d'un cas de mastocytose pure. Origine et évolution des mastocytes. *C.R. Acad. Sci.* 1950, *231*, 1178-1179.

HOBDAY (F.) : Observations on contagious venereal tumours in canine patients. *Vét. J.* 1905, 342-346.

HOLZ (A.) et ALBRECHT (M.) : Die Zuchtung von *Toxoplasma gondii* in Zellkulturen. *Ztschr. Hyg. Infectionskr.* 1953, *136*, 605-609.

HOTCHIN (J.E.) : The cultivation of Novikoff rat hepatoma cells « in vitro ». *Cancer Res.* 1957, *17*, 682-687.

HSU (T.C.) et POMERAT (C.M.) : Mammalian chromosomes « in vitro » III. On somatic aneuploidy. *J. Morphol.* 1953, *93*, 301-329.

HUGHES (A.) : Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures. *Quart. J. Micr. Sci.* 1952, *93*, 207.

HUNTER (J.W.), LAWS (G.H.) et LOEB (L.) : Investigations into the growth of the lymphosarcomata in dogs. *Univ. Pennsyl. Med. Bull.* 1909, *22*, 302.

JACKSON (C.) : The incidence and pathology of tumors of domesticated animals in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Sci.* 1936, *6*, 387-413.

JACKSON (C.) : The cytology of the contagious (venereal) tumor of the dog. *Onderstepoort J. Vet. Sci.* 1944, *20*, 97-117.

JACOBS (P.A.), BRUNTON (M.), COURTBROWN (W.M.), DOLL (R.) et GOLDSTEIN (H.) : Change of human chromosome count distributions with age : evidence for a sex difference. *Nature* 1963, *197*, 1080-1081.

JOUGLA (M.) : Polypes du vagin et localisation secondaire dans le cerveau d'une chienne. *Rev. Vét.* 1911, *36*, 212-215.

KAALUND-JORGENSEN (O.) et THOMSEN (A.) : Das übertragbare venerische Sarkom bei Hunden. *Zeit. Krebsforsch.* 1937, *45*, 385-398.

KAPLAN (H.S.) : The nature of the neoplastic transformation in lymphoid tumor induction. Ciba Found. Symposium Carcinogenesis Boston. Little, Brown & Co. 1959, 233-244.

KARLSON (A.G.) et MANN (F.C.) : The transmissible venereal tumor of dogs. Observations on forty generations of experimental transferts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1952, *54*, 1197-1213.

KAUFMAN (H.E.) et MALONEY (E.D.) : Multiplication of three strains of *Toxoplasma* in tissue culture. *J. Parasit.* 1962, *48*, 358-361.

KRITSCHEWSKI (J.L.) et RUBINSTEIN (P.L.) : Das durch Filtrate überimpfbare polymorphzellige Angiosarkom der Säugetiere. II Die Kultur dieser Geschwulst und Immunitätsforschung. *Zeitschr. Krebsforsch.* 1931, *34*, 85-98.

KUTNER (L.J.) et SOUTHAM (C.M.) : Growth of human cancer cells (Hep 2) in newborn rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1960, *104*, 785-787.

LACOUR (P.) : Contribution à l'étude du sarcome de Sticker. Etude clinique, cytologique et thérapeutique basée sur 66 observations originales. *Thèse vét.* Toulouse, 1949.

LACROIX (J.V.) et RISER (W.H.) : Transmissible lymphosarcoma of the dog. *North. Am. Vet.* 1947, *28*, 451-453.

LAGNEAU (F.) et CARTAUD (J.P.) : Essai de transmission d'une néoplasie vénérienne du Chien (Sarcome de Sticker). *Bul. Soc. Fr. Dermato. Syph.* 1960, *67*, 542-546.

LASSERRE (R.), PUGET (E.), VALLEE (M.) et BORREL (A.J.) : Embryocultures ultravirulentes à partir de tumeurs vénériennes du Chien. *C.R. Acad. Sci.* 1951, *232*, 1715-1716.

LEE (H.F.), BENDER (D.H.) et FRIEDGOOD (C.E.) : Heterologous tumor transplantation by intraveinous inoculation of the chick embryo. *Science* 1948, *107*, 374.

LEPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (P.) et PACCAUD (M.) : Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés. *Ann. Inst. Past.* 1956, *90*, 654-656.

LESBOUYRIES (G.) : Néoplasies vénériennes du chien et de la chienne. *Rec. Méd. Vét.* 1946, *122*, 5-19.

LESTOQUARD (F.) : Les néoplasmes vénériens contagieux et les tumeurs de la base du cœur chez le chien. *Rev. Méd. Vét.* 1937, *88*, 480-484.

LEVADITI (C.), SANCHIS-BAYARRI (V.), LEPINE (P.) et SCHOEN (R.) : Etude sur l'encéphalomyélite provoquée par le *Toxoplasma cuniculi*. *Ann. Inst. Past.* 1929, *43*, 1063-1080.

LEVAN (A.) et BIESELE (J.J.) : Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue cultures of mammalian cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1958, *71*, 1022-1053.

LEVAN (A.) et HAUSCHKA (T.S.) : Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. *J. Nat. Cancer. Inst.* 1953, *14*, 1-43.

LEWIS (W.H.) : Rhabdomyosarcoma. Rat tumor 92. Institute of Cancer Research Columbia University New York. *Cancer Res.* 1943, *3*, 867-871.

LOCK (J.A.) : Cultivation of *T. gondii* in tissue culture in mammalian cells. *Lancet* 1953, *264*, 324-325.

LOMBARD (L.S.) et MOLONEY (J.B.) : Experimental transmission of mast cell sarcoma in dogs. *Fed. Proc.* 1959, *18*, 490.

LOMBARD (L.S.), MOLONEY (J.B.) et RICKARD (C.G.) : Transmissible canine mastocytoma. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1963, *108*, Art. 3, 1086-1105.

LOPPNOW (H.) et NIEMAND (H.) : Zur formalen Genese der Retothelzarkomatose der Haut bei Hunden. *Zentr. Vet. Med.* 1959, *6*, 393-415.

LUSBAUGH (C.C.) et STEINER (P.E.) : Intraocular transplantation of malignant lymphomas of the mouse, dog and man in heterologous species. *Cancer Res.* 1949, *9*, 299-305.

LUTZ (B.R.), FULTON (G.P.), PATT (D.I.) et HANDLER (A.H.) : Growth rate of tumor transplants in cheekpouch of hamster (Abstr.). *Cancer Res.* 1950, *10*, 231-232.

MAC ALLISTER (R.M.) et CORIELL (L.E.) : Tumorigenicity of tissue culture cells. *Cancer Res.* 1959, *19*, 1040-1044.

MAC CLELAND (R.B.) : Neoplasms in dogs. *Cornell vet.* 1940, *30*, 161-165.

MAC CLELAND (R.B.) : Treatment of multiple round-cell sarcomas of the skin in dogs. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1947, *71*, 112.

MAC MICHAEL (H.), WAGNER (J.E.), NOWELL (P.C.) et HUNGERFORD (D.A.) : Chromosome studies of virus induced rabbit papillomas and derived primary carcinomas. *J. Nat. Cancer Inst.* 1963, *31*, 1197-1216.

MAC WHORTER (J.E.) et PRIME (I.) : A transplantable chondrosarcoma in a dog. *Ann. Surgery* 1916, *64*, 58-64.

MAITLAND (H.B.) et MAITLAND (M.C.) : Cultivation of vaccinia virus without tissue culture. *Lancet* 1928, *2*, 596-597.

MAKINO (S.) : A review on the chromosomes of domestic mammals. *Jap. J. Zootech.* 1949, *19*, 5-15.

HAUSCHKA (T.) : Correlation of chromosomal and physiologic changes in tumors. *J. Cell Comp. Physiol.* 1958, *52*, suppl. 1, 197-233.

HAWKING (F.) : Growth of Protozoa in tissue culture *V. Leishmania donovani*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1948, *41*, 545-554.

HAYFLICK (L.) et MOOREHEAD (P.S.) : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961, *25*, 585-621.

HEBRANT et ANTOINE : Deux cas de sarcome du fourreau chez le Chien. *Ann. Méd. Vét.* 1909, *58*, 133-138.

HENRY (A.) et BORY (L.) : Lymphosarcome de Sticker (sarcome infectieux et vénérien du Chien). *Bul. Soc. Fr. Dermato. Syph.* 1934, *41*, 1881-1883.

HILWIG (T.) : Entwicklung und Verhalten eines Rattensarkoms während 5 jähriger Züchtung in der Gewebekultur. *Zeitsch. Krebsforsch.* 1960, *63*, 222-231.

HISSARD (R.), MONCOURIER (L.) et JACQUET (J.) : Une nouvelle affection hématodermique : la mastocytose. *C.R. Acad. Sci.* 1950, *231*, 253-255.

HISSARD (R.), MONCOURIER (L.) et JACQUET (J.) : A propos d'un cas de mastocytose pure. Origine et évolution des mastocytes. *C.R. Acad. Sci.* 1950, *231*, 1178-1179.

HOBDAY (F.) : Observations on contagious venereal tumours in canine patients. *Vét. J.* 1905, 342-346.

HOLZ (A.) et ALBRECHT (M.) : Die Zuchtung von *Toxoplasma gondii* in Zellkulturen. *Ztschr. Hyg. Infectionskr.* 1953, *136*, 605-609.

HOTCHIN (J.E.) : The cultivation of Novikoff rat hepatoma cells « in vitro ». *Cancer Res.* 1957, *17*, 682-687.

HSU (T.C.) et POMERAT (C.M.) : Mammalian chromosomes « in vitro » III. On somatic aneuploidy. *J. Morphol.* 1953, *93*, 301-329.

HUGHES (A.) : Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures. *Quart. J. Micr. Sci.* 1952, *93*, 207.

HUNTER (J.W.), LAWS (G.H.) et LOEB (L.) : Investigations into the growth of the lymphosarcomata in dogs. *Univ. Pennsyl. Med. Bull.* 1909, *22*, 302.

JACKSON (C.) : The incidence and pathology of tumors of domesticated animals in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Sci.* 1936, *6*, 387-413.

JACKSON (C.) : The cytology of the contagious (venereal) tumor of the dog. *Onderstepoort J. Vet. Sci.* 1944, *20*, 97-117.

JACOBS (P.A.), BRUNTON (M.), COURTBROWN (W.M.), DOLL (R.) et GOLDSTEIN (H.) : Change of human chromosome count distributions with age : evidence for a sex difference. *Nature* 1963, *197*, 1080-1081.

JOUGLA (M.) : Polypes du vagin et localisation secondaire dans le cerveau d'une chienne. *Rev. Vét.* 1911, *36*, 212-215.

KAALUND-JORGENSEN (O.) et THOMSEN (A.) : Das übertragbare venerische Sarkom bei Hunden. *Zeit. Krebsforsch.* 1937, *45*, 385-398.

KAPLAN (H.S.) : The nature of the neoplastic transformation in lymphoid tumor induction. Ciba Found. Symposium Carcinogenesis Boston. Little, Brown & Co. 1959, 233-244.

KARLSON (A.G.) et MANN (F.C.) : The transmissible venereal tumor of dogs. Observations on forty generations of experimental transferts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1952, *54*, 1197-1213.

KAUFMAN (H.E.) et MALONEY (E.D.) : Multiplication of three strains of *Toxoplasma* in tissue culture. *J. Parasit.* 1962, *48*, 358-361.

KRITSCHEWSKI (J.L.) et RUBINSTEIN (P.L.) : Das durch Filtrate überimpfbare polymorphzellige Angiosarkom der Säugetiere. II Die Kultur dieser Geschwulst und Immunitätsforschung. *Zeitschr. Krebsforsch.* 1931, *34*, 85-98.

KUTNER (L.J.) et SOUTHAM (C.M.) : Growth of human cancer cells (Hep 2) in newborn rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1960, *104*, 785-787.

LACOUR (P.) : Contribution à l'étude du sarcome de Sticker. Etude clinique, cytologique et thérapeutique basée sur 66 observations originales. *Thèse vét.* Toulouse, 1949.

LACROIX (J.V.) et RISER (W.H.) : Transmissible lymphosarcoma of the dog. *North. Am. Vet.* 1947, *28*, 451-453.

LAGNEAU (F.) et CARTAUD (J.P.) : Essai de transmission d'une néoplasie vénérienne du Chien (Sarcome de Sticker). *Bul. Soc. Fr. Dermato. Syph.* 1960, *67*, 542-546.

LASSERRE (R.), PUGET (E.), VALLEE (M.) et BORREL (A.J.) : Embryocultures ultravirulentes à partir de tumeurs vénériennes du Chien. *C.R. Acad. Sci.* 1951, *232*, 1715-1716.

LEE (H.F.), BENDER (D.H.) et FRIEDGOOD (C.E.) : Heterologous tumor transplantation by intraveinous inoculation of the chick embryo. *Science* 1948, *107*, 374.

LEPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (P.) et PACCAUD (M.) : Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés. *Ann. Inst. Past.* 1956, *90*, 654-656.

LESBOUYRIES (G.) : Néoplasies vénériennes du chien et de la chienne. *Rec. Méd. Vét.* 1946, *122*, 5-19.

LESTOQUARD (F.) : Les néoplasmes vénériens contagieux et les tumeurs de la base du cœur chez le chien. *Rev. Méd. Vét.* 1937, *88*, 480-484.

LEVADITI (C.), SANCHIS-BAYARRI (V.), LEPINE (P.) et SCHOEN (R.) : Etude sur l'encéphalomyélite provoquée par le *Toxoplasma cuniculi*. *Ann. Inst. Past.* 1929, *43*, 1063-1080.

LEVAN (A.) et BIESELE (J.J.) : Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue cultures of mammalian cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1958, *71*, 1022-1053.

LEVAN (A.) et HAUSCHKA (T.S.) : Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. *J. Nat. Cancer. Inst.* 1953, *14*, 1-43.

LEWIS (W.H.) : Rhabdomyosarcoma. Rat tumor 92. Institute of Cancer Research Columbia University New York. *Cancer Res.* 1943, *3*, 867-871.

LOCK (J.A.) : Cultivation of *T. gondii* in tissue culture in mammalian cells. *Lancet* 1953, *264*, 324-325.

LOMBARD (L.S.) et MOLONEY (J.B.) : Experimental transmission of mast cell sarcoma in dogs. *Fed. Proc.* 1959, *18*, 490.

LOMBARD (L.S.), MOLONEY (J.B.) et RICKARD (C.G.) : Transmissible canine mastocytoma. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1963, *108*, Art. 3, 1086-1105.

LOPPNOW (H.) et NIEMAND (H.) : Zur formalen Genese der Retothelzarkomatose der Haut bei Hunden. *Zentr. Vet. Med.* 1959, *6*, 393-415.

LUSBAUGH (C.C.) et STEINER (P.E.) : Intraocular transplantation of malignant lymphomas of the mouse, dog and man in heterologous species. *Cancer Res.* 1949, *9*, 299-305.

LUTZ (B.R.), FULTON (G.P.), PATT (D.I.) et HANDLER (A.H.) : Growth rate of tumor transplants in cheekpouch of hamster (Abstr.). *Cancer Res.* 1950, *10*, 231-232.

MAC ALLISTER (R.M.) et CORIELL (L.E.) : Tumorigenicity of tissue culture cells. *Cancer Res.* 1959, *19*, 1040-1044.

MAC CLELAND (R.B.) : Neoplasms in dogs. *Cornell vet.* 1940, *30*, 161-165.

MAC CLELAND (R.B.) : Treatment of multiple round-cell sarcomas of the skin in dogs. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1947, *71*, 112.

MAC MICHAEL (H.), WAGNER (J.E.), NOWELL (P.C.) et HUNGERFORD (D.A.) : Chromosome studies of virus induced rabbit papillomas and derived primary carcinomas. *J. Nat. Cancer Inst.* 1963, *31*, 1197-1216.

MAC WHORTER (J.E.) et PRIME (I.) : A transplantable chondrosarcoma in a dog. *Ann. Surgery* 1916, *64*, 58-64.

MAITLAND (H.B.) et MAITLAND (M.C.) : Cultivation of vaccinia virus without tissue culture. *Lancet* 1928, *2*, 596-597.

MAKINO (S.) : A review on the chromosomes of domestic mammals. *Jap. J. Zootech.* 1949, *19*, 5-15.

MAKINO (S.) : A contribution to the study of the chromosomes in some Asiatic mammals. *Cytologia* 1952, *16*, 288-301.

MAKINO (S.) : The chromosome cytology of the ascites tumors of rats with special reference to the concept of the stemline cell. *Internat. Rev. Cytol.* 1957, *6*, 25-84.

MAKINO (S.) : Some epidemiologic aspects of venereal tumors of dogs as revealed by chromosome and DNA studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1963, *108*, Art. 3, 1106-1122.

MALONE (T.M.) : Spermatogenesis of the dog. *Trans. Am. Micr. Soc.* 1918, *37*.

MANN (F.C.) : Attempts to obtain a transplantable tumor in the higher species of animals. *J. Cancer Res.* 1919, *4*, 331-347.

MANUELIDIS (E.E.) : Heterologous transplantation of tissue cultures lines. *Cancer Res.* 1961, *21*, 876-880.

MANUELIDIS (E.E.) et POND (A.R.) : Continuous cultivation of cells arising from human case of glioblastoma multiforme (glioma TC 178). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1959, *102*, 693-695.

MARKO (A.M.) et BUTLER (G.C.) : The isolation of sodium desoxyribonucleate with sodium dodecylsulfate. *J. Biol. Chem.* 1951, *190*, 165-176.

MARQUES (P.), BRU (A.), NANTA (A.), BAZEX (A.), LASSERRE (R.), PUGET (E.), VALLEE (M.) et BOREL (A.) : Les tumeurs vénériennes du chien (sarcome de Sticker) matériel de radiobiologie expérimentale. *Bul. Ass. Fr. Et. Cancer.* 1952, *39*, 110-115.

MATSUBA (S.) et HIROYE (I.) : Studies on the venereal tumor in the dog. *J. Jap. Soc. Vet. Sci.* 1927, *6*, 167-173.

MAUPIN (B.) : Techniques de séparation des globules blancs II. Techniques de séparation globale des leucocytes sanguins. *Rev. Hématologie.* 1959, *14*, 355-379.

METTAM (A.E.) : Note on the presence of *Spirochaetes* in an infective sarcoma of the vagina of the bitch. *Vet. J.*. 1907, *14*, 80.

MEYER (H.) et DE OLIVEIRA (M.X.) : Conservaçao de protozoarios em cultures de tecidos mantidas a temperatura ambiante. *Rev. Brasil. Biol.* 1943, *3*, 341-343.

MILES (C.P.) : Morphology and functionnal relations of sex chromatin in cultured amnion cells. *Exp. Cell Res.* 1960, *20*, 324-337.

MINOUCHI (O.) : The spermatogenesis of the dog, with special reference to meiosis. *Jap. J. Zool.* 1928, *1*, 255-268.

MIRSKY (A.E.) et POLLISTER (A.W.) : Nucleoproteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 1942, *28*, 344-352.

MIRSKY (A.E.) et POLLISTER (A.W.) : Chromosin, a desoxyribose nucleoprotein complex of the cell nucleus. *J. Gen. Physiol.* 1946, *30*, 117-148.

MONTPELLIER (J.M.), DIEUZEIDE (R.) et VICREY (F.) : Sarcome infectieux vénérien du chien. *Gaz. hebd. Sci. méd. Bordeaux* 1936, *57*, 176-181.

MONTPELLIER (J.M.), MERCIER et LAFFARGUE (P.) : Deuxième cas algérien de sarcome infectieux vénérien du chien. *Maroc Méd.* 1939, *17*, 329-330.

MOORE (K.L.) et BARR (M.L.) : The sex chromatin in benign tumours and related conditions. *Brit. J. Cancer* 1955, *9*, 246-252.

MOORE (K.L.) et BARR (M.L.) : The sex chromatin in human malignant tissues. *Brit. J. Cancer* 1957, *11*, 384-390.

MORGAN (J.F.), MORTON (H.J.) et PARKER (R.C.) : Nutrition of animal cells in tissue culture I. Initial studies on a synthetic media. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1950, *73*, 1-8.

MUHLPFORDT (H.) : Das Verhalten Sarcceporidien-infiziertier Tiere im Sero-Farbtest auf *Toxoplasma* nach Sabin-Feldman. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 1951, *3*, 205-215.

MULLIGAN (R.M.) : Neoplastics diseases of dogs. *Arch. Path.* 1948, *46*, 477-492.

MULLIGAN (R.M.) : Neoplasms of the dog. Baltimore - Williams and Wilkins Company 1949, 93-95.

NANTA (A.), BAZEX (A.), BRU (A.), LASSERRE (R.), PUGET (E.), BONNEAU, LACOUR (P.) : Les tumeurs vénériennes du chien et de la chienne dans la région toulousaine. *Rev. Méd. Vét.* 1948, *99*, 529-531.

NANTA (A.), LASSERRE (R.), BAZEX (A.) et PUGET (E.) : Le sarcome de Sticker. *Le sang*, Paris 1949, *20*, 554-557.

NANTA (A.), MARQUES (P.), LASSERRE (R.), BAZEX (A.), BRU (A.) et PUGET (E.) : Premiers résultats d'une enquête sur les tumeurs vénériennes du chien et de la chienne dans le Sud-Ouest de la France. *Rev. Méd. Vét.* 1949, *100*, 393-413.

NANTA (A.), MARQUES (P.), LASSERRE (R.), BAZEX (A.), BRU (A.) et PUGET (E.) : Les tumeurs vénériennes du chien. Cadre nosologique. *Rev. Méd. Vét.* 1950, *101*, 356-367.

NANTA (A.), MARQUES (P.), LASSERRE (R.), BAZEX (A.), BRU (A.), PUGET (E.), VALLEE (M.) et BOREL (A.) : Les tumeurs vénériennes du chien. Embryo-culture d'un ultra-virus. *Rev. Méd. Vét.* 1951, *102*, 262-265.

NANTA (A.), MARQUES (P.), LASSERRE (R.), VALLEE (M.), BAZEX (A.), BRU (A.), PUGET (E.) et BOREL (A.) : Les tumeurs vénériennes du chien. *Rev. Méd. Vét.* 1953, *104*, 538-543.

NANTA (A.), MARQUES (P.), LASSERRE (R.), BAZEX (A.), BRU (A.), PUGET (E.) et BOREL (A.) : Les tumeurs vénériennes du chien. *Rev. Méd. Vét.* 1953, *104*, 607-625.

NANTA (A.), MARQUES (P.), LASSERRE (R.), VALLEE (M.), BAZEX (A.), BRU (A.), PUGET (E.) et BOREL (A.) : Les tumeurs vénériennes du chien. *Rev. Méd. Vét.* 1953, *104*, 690-696.

NEVEU (M.) : Contribution à l'étude du sarcome de Sticker. Essais de thérapeutique médicale. *Thèse Vét.* Toulouse 1949.

NIELSEN (S.W.) : The clinical aspects of mastocytoma in dogs. *Proc. Book, Am. Vet. Med. Ass.* 1952, 212-217.

NIELSEN (S.W.) et COLE (C.R.) : Canine mastocytome. A report of one hundred cases. *Am. J. Vet. Res.* 1958, *19*, 417-432.

NIELSEN (S.W.) et COLE (C.R.) : Homologous transplantation of canine neoplasms. *Am. J. Vet. Res.* 1961, *22*, 663-672.

NOVAK (E.) et CRAIG (R.G.) : Infectious sarcoma (« venereal granuloma ») of the vagina in dogs. *Arch. Path. Lab. Med.* 1927, *3*, 193-202.

NOVINSKI (M.) : Zur Frage über die Impfung der Krebsigen Geschwülste. *Zentralbl. Med. Wissensch.* 1876, *14*, 790-791.

NOVINSKI (M.) : K voprosu o privivamii zlokachestvennich novoobrazovanii (experimentalnoi issledovanie). (Sur la question de l'inoculation des neoplasmes malins. Recherches expérimentales). *Thèse*, Saint-Pétersbourg 1877.

NOWELL (P.C.), HUNGERFORD (D.A.) et BROOKS (C.D.) : Chromosomal characteristics of normal and leukemic human leucocytes after short-term tissue culture. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 1958, *2*, 331-332.

OHNO (S.) et KINOSITA (R.) : Malignancy and transplantability of the mouse lymphoid leukemia cells as reflected on their chromosome complements. *Fed. Proc.* 1958, *17*, 450.

ORSI (E.V.) et RITTER (H.B.) : A report of sex chromatin in human tumor tissue culture. *Exp. Cell Res.* 1958, *15*, 244-246.

OTTOSEN (H.E.) : Studies on sarcomata of the skin in dogs. *Nord. Vet. Med.* 1949, *1*, 7-30.

PAFF (G.H.), BLOOM (F.) et REILLY (C.) : The morphology and behavior of neoplastic mastcells cultivated « in vitro ». *J. Exp. Med.* 1947, *86*, 117-124

PAI (H.C.) et HU (C.H.) : Attempts to grow *L. donovani* in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1941, *46*, 606-608

PALLASKE (G.) et HERZOG (A.) : Pathology of mastocytosis in dogs. *Rindertuberk. u. Brucellose* 1963, *12*, 45-54.

PAROT (H.) : Contribution à l'étude des tumeurs vénériennes du chien (formes atypiques). *Thèse Vét.* Toulouse 1954.

PELOURO (J.T.) : Existencia em Portugal do sarcoma venereo dos caes. *Repos. Lab. Pat. Vet.* Lisboa 1942, *5*, 83-89.

PELOURO (J.T.) : Um novo caso de sarcoma de Sticker no cao. *Repos. Lab. Pat. Vet.* Lisboa 1943, *6*, 247-250.

PIPKIN (A.C.) : Avian embryos and tissue culture in the study of parasitic protozoa. II ; Protozoa other than Plasmodium. *Exper. Paras.* 1960, *9*, 167-203.

PRIER (J.E.) : Nutritional requirements for cultivation of the canine transmissible sarcoma cell. *Cancer Res.* 1963, *23*, 695-699.

PULVERTAFT (R.V.), VALENTINE (J.C.) et LANE (W.F.) : The behavior of *Toxoplasma gondii* on serum-agar culture. *Parasit.* 1954, *44*, 478-484.

PULVERTAFT (R.V.) et HOYLE (G.F.) : Stages in the life cycle of *Leishmania donovani*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1960, *54*, 191-196.

RENK : Ueber Retikulosen und Lymphogranuloma bei Hunden. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* 1958, *98*, 214-215.

RESSANG (A.), TITUS (I.), KOERJANA, SIKAR, NABIB (R.) : Venereal sarcoma in the dog. *Commun. Vet. Bogor.* 1958, *2*, 1-19.

ROSANOFF (E.I.) : Continuous cultivation of malignant cells from a canine testicular tumor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1959, *100*, 384-387.

ROTHFELS (K.H.) et SIMINOVITCH (L.) : An air-drying technique for flattening of mammalian chromosomes. *Stain technol.* 1958, *33*, 73-77.

RUST (J.H.) : Transmissible lymphosarcoma in the dog. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1949, *114*, 10-14.

SABIN (A.B.) et OLITSKY (P.K.) : *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitim. *Science* 1937, *85*, 336-338.

SACHS (L.) et GAILLILY (R.) : The chromosomes and transplantability of tumors. II. Chromosomes duplication and the loss of strain specificity in solid tumors. *J. Nat. Cancer Inst.* 1956, *16*, 803-841.

SAN FELICE : Sulla inoculabilita dei tumori maligni. *Riforma Med.* 1904, *20*, 981.

SANFORD (K.K.), EARLE (W.R.), SHELTON (E.), SCHILLING (E.L.), DUCHESNE (E.M.), LIKELY (G.D.) et BECKER (M.M.) : Production of malignancy in vitro. XII Further transformation of mouse fibroblasts to sarcomatous cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 1950, *11*, 351-376.

SANFORD (K.K.), LIKELY (G.L.), EVANS (V.J.), MACKEY (C.J.) et EARLE (W.R.) : The production of sarcomas from cultured tissues of hepatoma, melanoma and thyroid tumors. *J. Nat. Cancer Inst.* 1952, *12*, 1057-1077.

SANG (L.) et MAURIN (J.) : Isolement et entretien en lignée continue d'une souche de cellules provenant d'un exsudat péritoneal de lapin (souche EPL). *Ann. Inst. Past.* 1960, *99*, 210-213.

SCHUHOVA (V.), BONNOVÉ (E.), HUBNERA (J.) et SASKOVC (Z.) : Serial propagation of *Toxoplasma gondii* in stationary tube cultures of Hela cells. *Ceslolov. Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 1956, *5*, 161-163.

SCHUSTER (H. von), SCHRAMM (G.) et ZILLIG (W.) : Die Struktur der Ribonucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch.* 1956, *11 b*, 339-345.

SCOTTI (T.M.), WRYK (M.A.), DORSEY (M.) et SIGEL (M.M.) : Transplantation of human malignant epithelial cells from tissue culture to rat brains. *Cancer Res.* 1960, *20*, 58-61.

SELIGMAN (C.G.) : Infective venereal tumors in New Guinea dogs. *Third Scient. Rep. Invest. Imp. Cancer Res. Found.* 1908, *3*, 36-51.

SEVAG (M.G.), LACKMAN (D.B.) et SMOLLENS (J.) : The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form. *J. Biol. Chem.* 1938, *124*, 425-436.

SHABAD (L.M.) : M.A. Novinsky, rodonachalnik experimentalnoi onkologii. (M.A. Novinsky, grand-père de l'oncologie expérimentale). *Moscow, Acad. Med. Nauk.* USSR 1950.

SHIMKIN (M.B.) : M.A. Novinsky : A note on the history of transplantation of tumors. Cancer 1955, *8*, 653-655.

SMITH (G.B.) et WASHBOURN (J.W.) : Infective venereal tumors in dogs. *Tr. Path. Soc. London* 1897, *48*, 310-323.

SMITH (G.B.) et WASHBOURN (J.W.) : Infective venereal tumours in dogs. *J. Path. Bact.* 1898, *5*, 99-110.

SMITH (G.B.) et WASBOURN (J.W.) : Infective sarcomata in dogs. *Brit. Med. J.* 1898, *2*, 1807-1810.

SMITH (G.B.) et WASHBOURN (J.W.) : Infective sarcomata in dogs. *Brit. Med. J.* 1899, *3*, 1346-1347.

SOHVAL (A.R.) et GAINES (J.A.) : Sexual differences in nuclear morphology of tumors, inflammation, hyperplasia and squamous metaplasia. *Cancer* 1955, *8*, 896-902.

SOLACROUP (J.P.) : Contribution à l'étude du « sarcome de Sticker ». Considérations étiologiques sur l'affection. *Thèse Vét.* Toulouse 1950.

SOUTHAM (C.M.), BABCOCK (V.I.) et DE MASI (M.) : Growth of several human cell lines in newborn rats. *Cancer Res.* 1964, *24*, 345-355.

STEWART (S.E.), EDDY (B.E.), GOCHENOUR (A.M.), BORGESE (N.G.) et GRUBBS (G.E.) : The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology* 1957, *3*, 380-400.

STICKER (A.) : Transplantable Lymphosarcom des Hundes. Ein Beitrag zur Lehre der Krebsübertragbarkeit. *Ztschr. Krebsforsch.* 1904, *1*, 413-444.

STICKER (A.) : Transplantable Lymphosarcom des Hundes. *Berl. tierärtztl. Wochenschr.* 1905, *21*, 353-358.

STICKER (A.) : Transplantable Rundzellensarkom des Hundes. Ein Beitrag zur Lehre der Krebsübertragbarkeit. *Ztschr. Krebsforsch.* 1906, *4*, 227-314.

STICKER (A.) : Infektiöse und krebsige Geschwülste an den äussern Geschlechtsorganen des Hundes. *Arch. klin. Chir.* 1906, *78*, 773-800.

STICKER (A.) : Die Beeinflussung bösartiger Geschwülste durch Atoxyl und fremdartiges Eiweissstoff. *Berl. Wochenschr.* 1908, *2*, 1391-1394.

STOCKER (M.) et MAC PHERSON (I.) : Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus « in vitro ». *Virology* 1961, *14*, 359-370.

STUBBS (E.L.) et FURTH (J.) : Experimental studies on venereal sarcoma of the dog. *Am. J. Path.* 1934, *10*, 275-286.

SUGIURA (K.) et COHEN (I.) : Further study on the direct and indirect actions of radiations on malignant cells. I Transplantation of tissue cultures of mouse sarcoma 180 after exposure to Roentgen rays. II Cultures of tumors irradiated « in vivo ». *Radiology* 1939, *32*, 71-76.

SWIN (H.E.) et PARKER (R.F.) : Preservation of cell cultures at 4° C. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1955, *89*, 549-553.

TAKAYAMA (S.) : Existence of a stemcell lineage in an infectious venereal tumor of the dog. *Jap. J. Gen.* 1958, *33*, 56-64.

TAKAYAMA (S.) et MAKINO (S.) : Cytological studies of tumors. XXXV A study of chromosomes in venereal tumors of the dog. *Z. Krebsforsch.* 1961, *64*, 253-261.

TAKAYAMA (S.) et OJIMA (Y.) : A study of the desoxyribonucleic acid content in some dog venereal tumors. *Jap. J. Genet.* 1961, *36*, 206-209.

TAKAYAMA (S.) et OJIMA (Y.) : Additional notes on the chromosomes of the venereal tumors of the dog. *Kwansei Gakuin Univ. Ann. St.* 1962, *11*, 99-107.

TAVARES (A.S.) : Sex chromatin in tumors cells. *Acta cytologica.* 1962, *6*, 90-94.

TCHERNOMORETZ (I.) : The tissue culture of L.D. bodies of *L. donovani* and *L. infantum* from flagellates. *Ha. Refuah. (J. Palestine Med. Ass.)* 1946, *30*, 87-89.

THIERY (G.) : Premiers résultats de l'étude du sarcome vénérien de Sticker greffé sur des chiens impubères. *C.R. Soc. Biol.* 1950, *144*, 743-744.

THIERY (G.) : Pouvoir cancérigène des thymo-nucléo-protéines extraites du sarcome de Sticker. *C.R. Soc. Biol.* 1950, *144*, 745-747.

THIERY (G.) : Culture « in vivo » du sarcome de Sticker dans le liquide céphalo-rachidien. *Rec. Méd. Vét.* 1954, *130*, 232-233.

THOMAS (J. André) : Conception du système réticulo-histiocytaire : la régulation de l'état histiocytaire et la spécificité cellulaire. *Rev. Hématologie* 1949, *4*, 639-654.

THOMAS (J. André) : Evolution des tumeurs induites chez le Hamster par inoculation intra-péritonéale des cultures de cellules BHK 21/13. *C.R. Acad. Sci.* 1964, *258*, 5554-5557.

THOMAS (J. André), FOUQUET (J.P.), HOLLANDE (E.), POUCHELET (M.) et VALLET (D.) : Etude comparative du chondriome et du caryotype des cellules BHK 21/13 et des cellules cancéreuses H 54 qui en dérivent. *C.R. Acad. Sci.* 1964, *258*, 6273-6276.

THOMAS (J. André), FOUQUET (J.P.), HOLLANDE (E.), POUCHELET (M.) et VALLET (D.) : Etude comparative de l'évolution du chondriome, des enclaves virales et du caryotype dans 3 souches cellulaires infectées par un virus « associé » BHK 21/13, H 54 A, H 54 B. *Arch. Biologie* 1965 (à paraître).

TJIO (J.H.) et OSTERGREN (G.) : The chromosomes of primary mammary carcinomas in milk virus strains of the mouse. *Hereditas* 1958, *44*, 451-465.

TOOLAN (H.W.) : Growth of human tumors in cortisone treated laboratory animals : the possibility of obtaining permanently transplantable human tumors. *Cancer Res.* 1953, *13*, 389-394.

TOOLAN (H.W.) : Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals : HS 1, HEp 1, HEp 2, HEp 3 et H.Emb. RH 1. *Cancer Res.* 1954, *14*, 660-666.

TOWBIN (A.) : The heterologous transplantation of human tumors. *Cancer Res.* 1951, *11*, 716-722.

UTZIG (J.) et SAMBORSKI (Z.) : Influence of three-terpenes present in the « *Polyporus betulinus* » on Sticker's tumor. *Med. Weteryn.* 1957, *13*, 481-484.

VERLINDE (J.D.) et WINSSER (J.) : Over een geval van maligne reticulo-endotheliose bij den hond. *Tijdschr. Diergeneesk.* 1947, *72*, 110-113.

VERNE (J.), OBERLING (C.) et GUERIN (M.) : Tentatives de culture « in vitro » de l'agent de la leucémie transmissible des poules. *C.R. Soc. Biol.* 1936, *121*, 403-405.

VISCHER (W.A.) et SUTTER (E.) : Intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* in adult mammalian macrophages cultivated « in vitro ». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 1954, *86*, 413-419.

VLADUTIU (O.) et CIUREA (V.) : Cercetari experimentale a supra « tumorilor venerice ». *Lucr. sti. Inst. Agron. « N. Balcescu » Ser. C. Romin.* 1961, *5*, 305-327.

VLADUTIU (O.), MURGU (I.) et BLIDARU (T.) : Contributi la studiul si tratamentul tumorilor venerice la catea si pisica. *Lucr. sti. Inst. Agron. « N. Balcescu » Ser. C. Romin.* 1960, *4*, 269-286.

VLADUTIU (O.), MURGU (I.), BLIDARU (T.) et POLL (E.) : Chimioterapia tumori venerice a ciinilor. *Lucr. sti. Inst. Agron. « N. Balcescu » Ser. C. Romin.* 1961, *5*, 329-338.

VOS (J.J.) : Overentbear sarcom aan genitalien van indische kamponghonden. *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indie* 1935, *75*, 263.

WADE (H.) : An experimental investigation of infective sarcoma of the dog with a consideration of its relationship to cancer. *J. Path. Bact.* 1908, *12*, 384-425.

WATANABE (F.) et AZUMA (M.) : Cytological confirmation of fluid infection in the venereal tumor of dogs. *Gann* 1956, *47*, 23-35.

WATANABE (F.) et HATA (K.) : Study of the clinicaly so-called infectious venereal sarcoma of dogs. I - Tumor cells in the secretion from the ulcerated surface of venereal tumors. *Gann* 1953, *44*, 189-191.

WATANABE (F.), HOSAKA (T.) et AZUMA (M.) : Study of the clinically so-called infectious venereal sarcoma of dogs. III - Chromosomes of free sarcoma cells in the secretion from the venereal sarcoma of dogs, with particular regard to aqueous infection by transmission of free tumor cells. *Gann*, 1955, *46*, 404-406.

WATANABE (F.) et URANO (K.) : Study of the clinically so-called infectious venereal sarcoma of dogs. II - Histological observation of venereal tumors of dogs. *Gann* 1954, *45*, 331-333.

WEHR : Demonstration der durch Impfung von Hund auf Hund erzeugten Carcinomknöchten. *Verhandl. Deutsch. Gesellsch. Chir.* 1888, *17*, 52-53.

WEHR : Weitere Mitteilungen über die positiven Ergebnisse der Carcinom-Ueberimpfungen von Hund auf Hund. *Arch. Klin. Chir.* 1889, *39*, 226-228.

WEINMAN (D.) : Factors affecting the morphology of *Leishmania tropica* forms in cultures. *Parasitology* 1939, *31*, 185-192.

WHITE (C.P.) : Contagious growth in dogs. *Brit. Med. J.* 1902, *2*, 176-177.

WILLIAMS (W.J.), LARSON (E.) et PHILLIPS (T.L.) : A neoplastic connective tissue mastcell capable of continuous growth in tissue culture. *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 1959, *6*, 361-368.

WILLIS (R.A.) : Pathology of tumours. Butterworth. London, 1948.

WONG (A.I.H.) et K'ANG (H.J.) : Radium treatment in the so-called infectious sarcoma of dogs. *Chinese Med. J.* 1932, *46*, 377-382.

WOODS (G.T.) : Observations on transmissible canine venereal granuloma. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1957, *130*, 171-172.

YEN (A.C.) et CHUNG (H.L.) : Cultivation of *Leishmania donovani* in media of embryochick tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1934, *31*, 1258-1259.

YOUNGER (J.S.) : Monolayer tissue culture. I. Preparation and standardisation of suspensions of trypsin dispersed monkey kidney cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954, *85*, 202-205.

ICONOGRAPHIE

Figure 1 : Sarcome de Sticker naturel :
Polype du vagin.

— 2 : Sarcome de Sticker greffé chez le Chien :
Tumeur du fourreau.

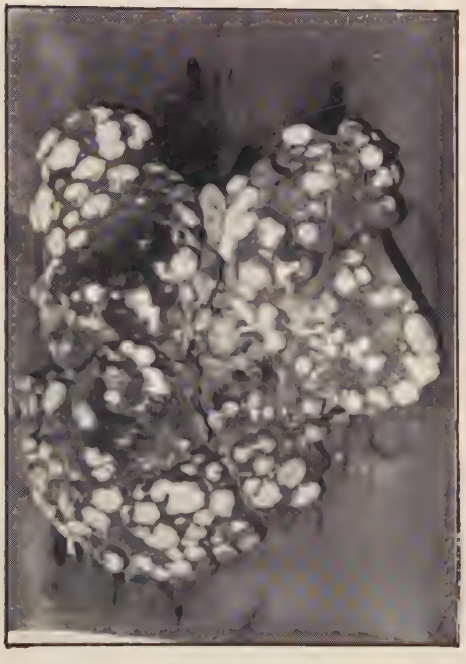
— 3 : Sarcome de Sticker greffé chez le Chien dans le péritoine :
Multiples petits nodules sur l'épiploon.

— 4 : Sarcome de Sticker greffé chez le Chien :
Métastases dans le foie.

1

2

3



4

Figure 5 : Sarcome de Sticker naturel :
Après irradiation et guérison apparente, métastase ovarienne.

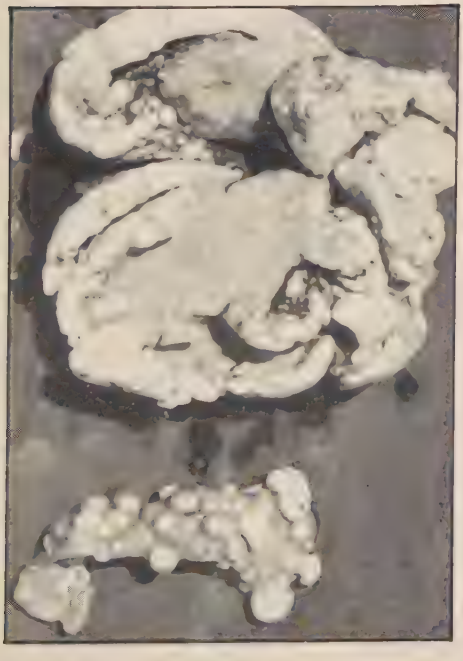
— 6 : Sarcome de Sticker greffé chez le Chacal :
Tumeur du fourreau.

— 7 : Sarcome de Sticker greffé chez le Chacal :
Métastases dans le foie et la rate.

— 8 : Sarcome de Sticker greffé dans la bajoue du Hamster.

5

6



7

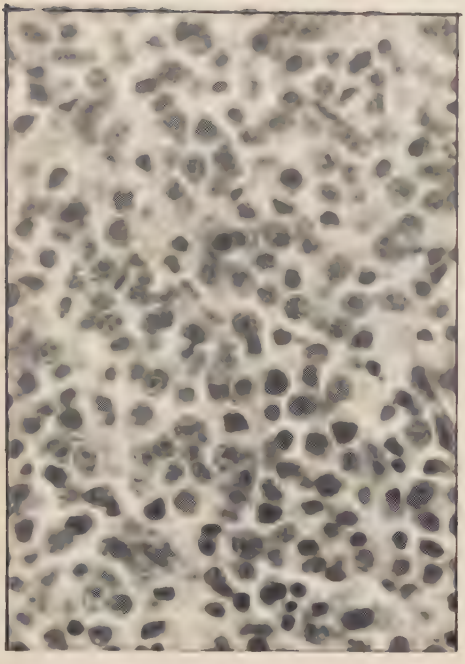
8

Figure 9 : Sarcome de Sticker naturel. Histologie.
Hémalun-éosine. (× 480).

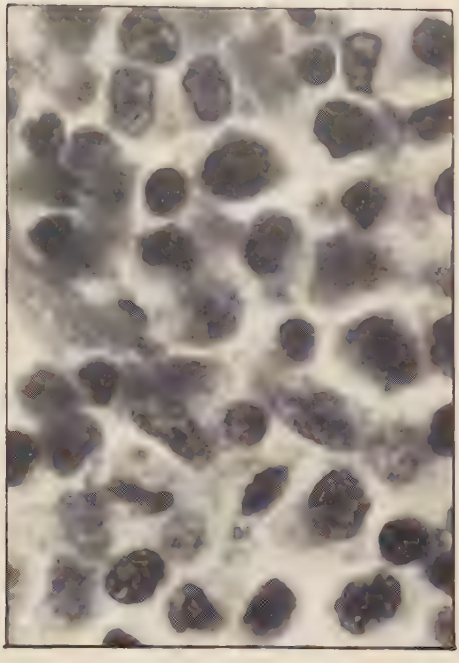
— 10 : Même tumeur. (× 1200).

— 11 : Sarcome de Sticker greffé dans la bajoue du Hamster.
Hémalun-éosine. (× 480).

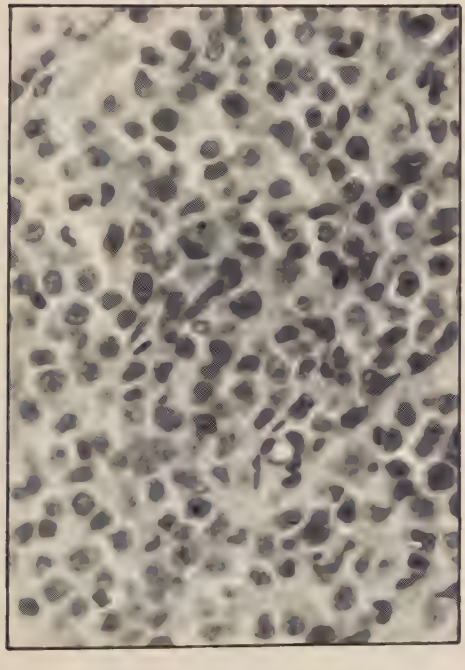
— 12 : Sarcome de Sticker greffé chez le Chien.
Métastase hépatique. (× 480).



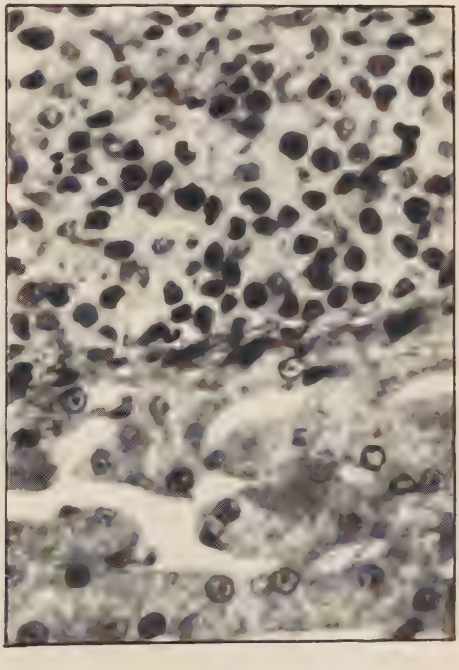
9



10



11



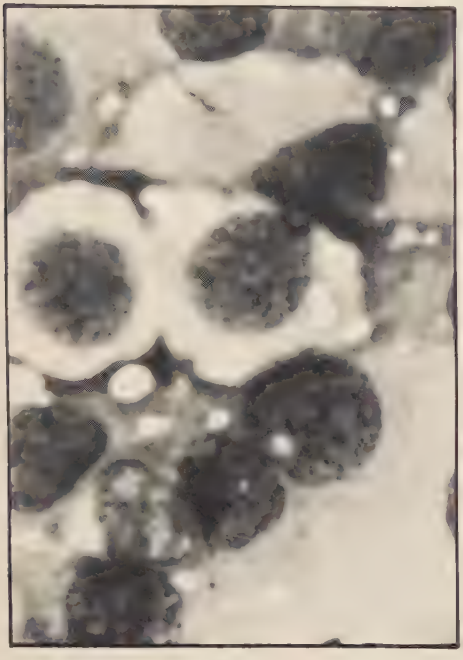
12

Figure 13 : Sarcome de Sticker greffé chez le Chien.
Association de deux types cellulaires : cellule réticulaire et histiocyte.
Empreinte. Giemsa. (× 1500).

— 14 : Sarcome de Sticker cultivé « in vitro » en explant sur plasma de poulet. Cellules de type fibroblastique. (× 300).

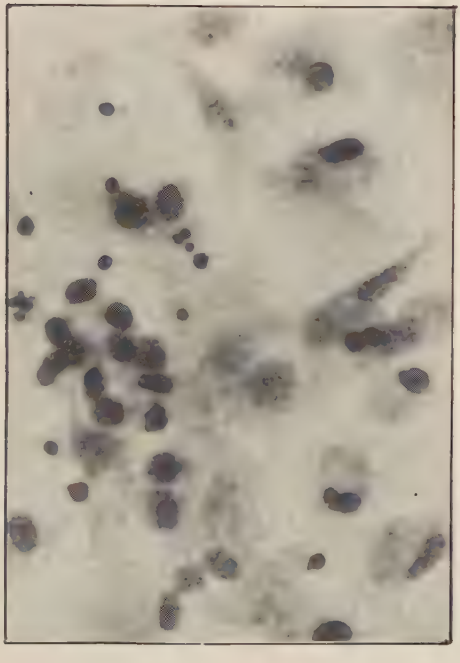
Figure 15 : Sarcome de Sticker cultivé « in vitro ». 3e jour de culture après trypsination. Début de l'étalement des cellules. (× 480).

— 16 : Sarcome de Sticker. Culture « in vitro » après trypsination.
Palade. Hématoxyline ferrique. (× 480).

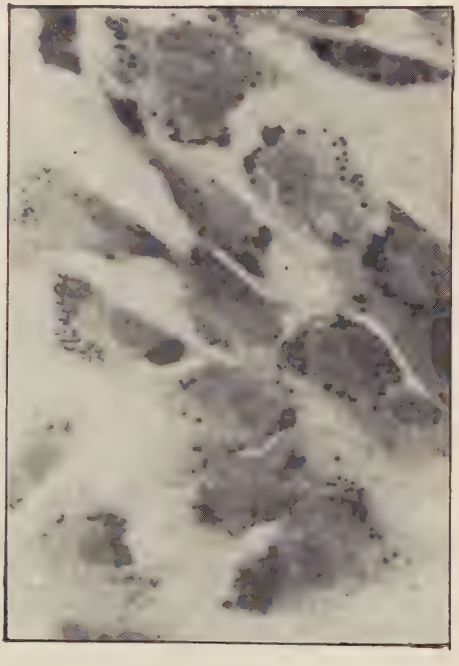


13

14



15



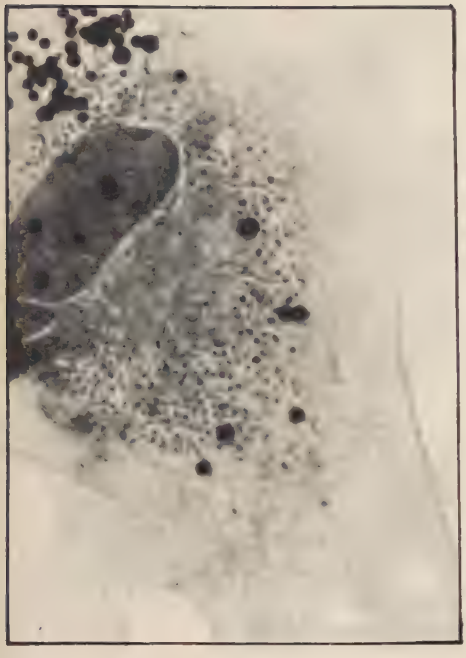
16

Figure 17 : Même culture. Division du cytoplasma en trois zones. (× 1500).

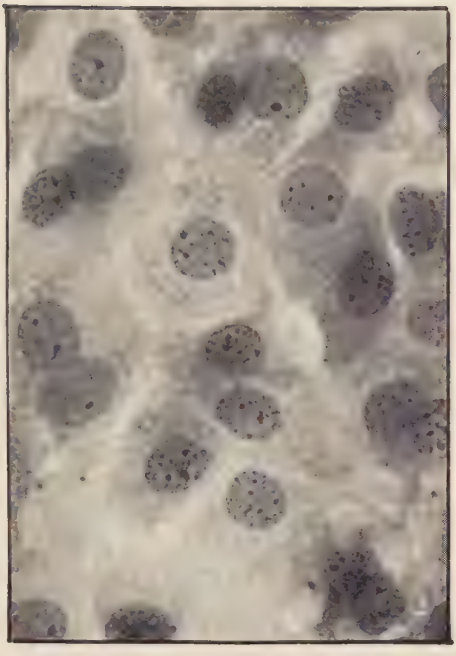
— 18 : Souche 503 au 170e passage :
Tapis continu de cellules. (× 600).

— 19 : Souche 503. Retour des cellules précédentes au type fibroblastique par culture sur plasma de poulet. (× 300).

— 20 : Souche 503 au 49e passage.
Athrocytose du carmin lithiné. (× 1500).



17



18

19

20

Figure 21 : Souche 579 contaminée par *Toxoplasma gondii*.
Début de la multiplication du parasite dans une cellule. (× 1200).
— 22 : Souche 503 inoculée avec *Toxoplasma gondii*.
Formation des rosettes. (× 1200).
— 23 : Souche 503 inoculée avec *Leishmania donovani*. (× 1500).
— 24 : Souche 503 inoculée avec *Leishmania enrietti*. (× 720).

21

22

23

24

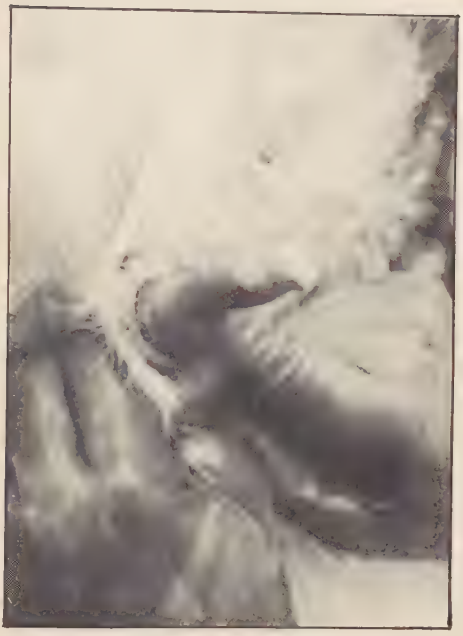
Figure 25 : Chien 240 inoculé avec les cellules de la souche 503 :
Papule au point d'inoculation.

— 26 : Chien 256 inoculé avec les cellules de la souche 503 :
Granulations à la base de la verge.

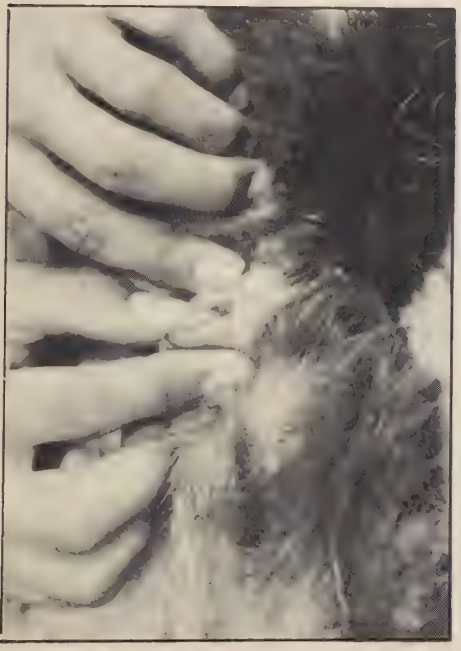
— 27 : Chienne 272 inoculée avec les cellules de la souche 503 :
Petit polype à la commissure supérieure de la vulve.

— 28 : Chien 260 inoculé avec les cellules de la souche 579 au 6e passage. Masse tumorale en arrière des bulbes entre le pénis et le plancher abdominal.

25



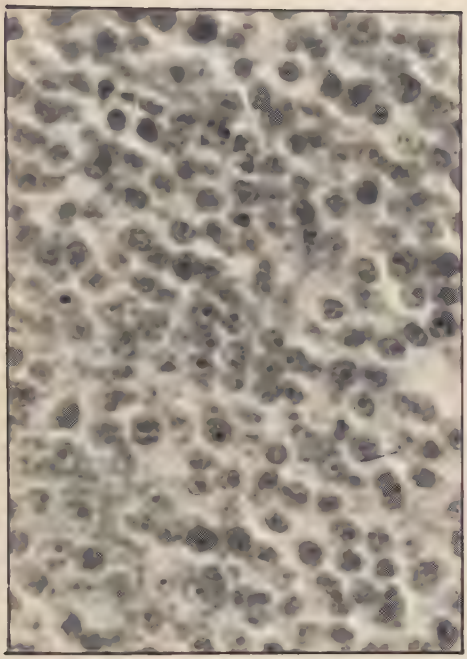
26



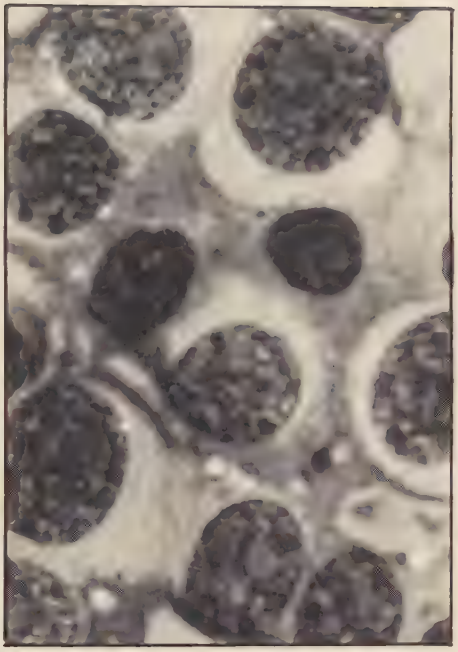
27

28

Figure 29 : Tumeur du chien 260 : Histologie. (× 480).
— 30 : — : Empreinte. Giemsa.
Même image que figure 13. (× 1500).
— 31 : Rein de Chien mâle cultivé « in vitro ».
78 chromosomes dont 1 médiocentrique. (× 1500).
— 32 : Rein de Chien femelle cultivé « in vitro ».
78 chromosomes dont 2 médiocentriques. (× 1500).

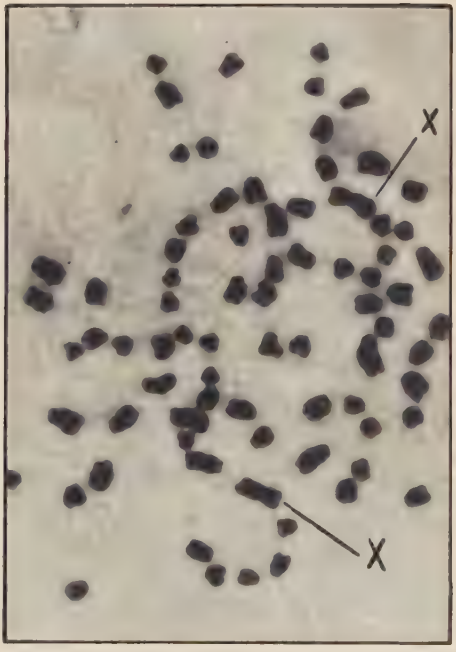


29



30

31



32

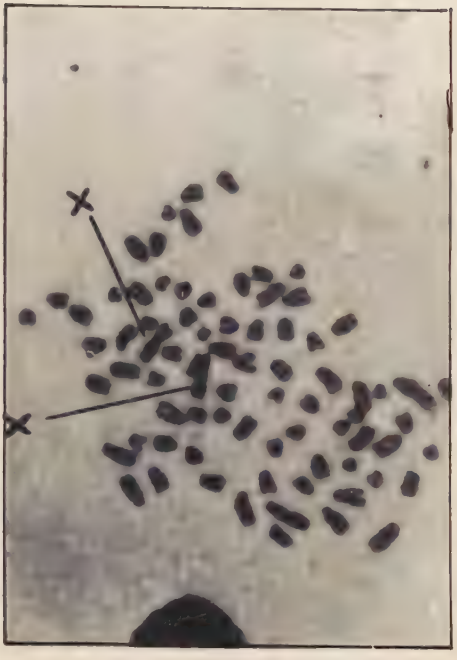
Figure 33 : Sarcome de Sticker greffé chez le chien mâle.
Culture « in vitro ». 77 chromosomes dont 1 médiocentrique. (× 1500).

— 34 : Sarcome de Sticker greffé chez le chien femelle.
Culture « in vitro ». 78 chromosomes dont 2 médiocentriques. (× 1500).

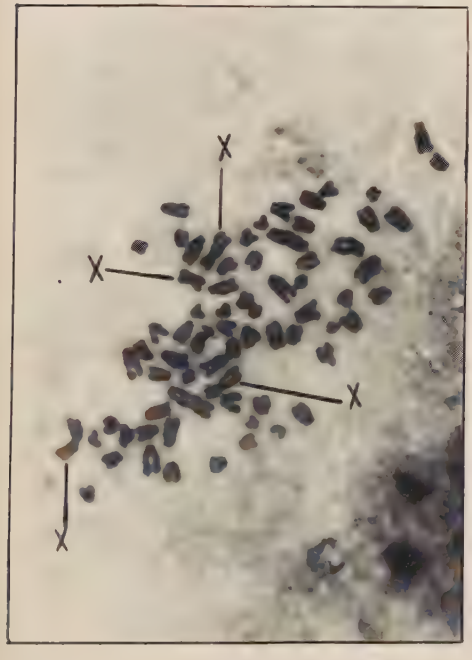
— 35 : Souche 503. Lignée β 2 A au 83e passage.
70 chromosomes dont 4 médiocentriques. (× 1500).

— 36 : Souche 503. Lignée β 2 B au 96e passage.
128 chromosomes dont 5 médiocentriques. (× 1500).

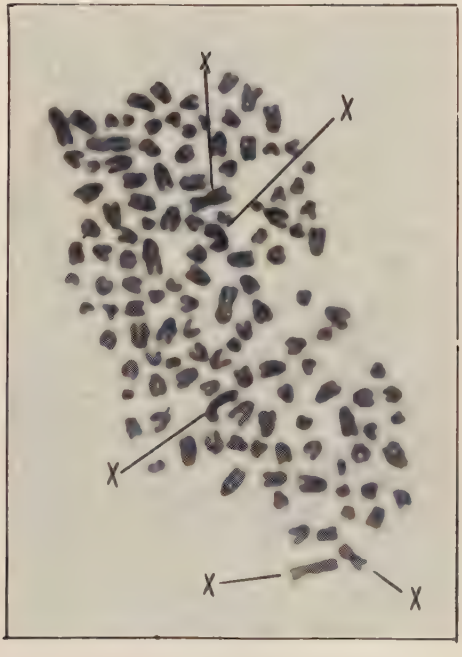
33



34



35



36

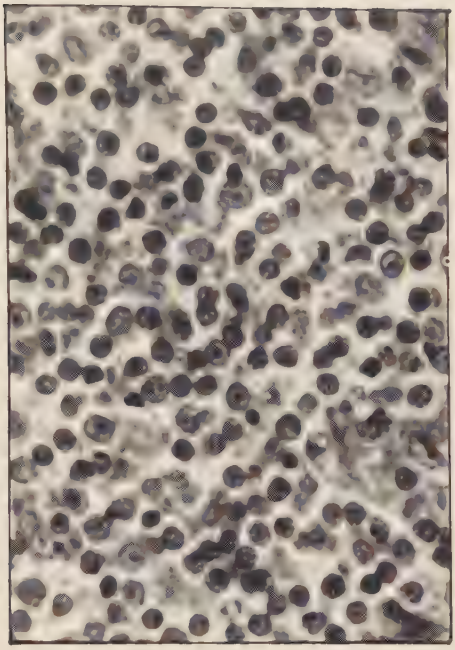
Figure 37 : Sarcome de Sticker greffé chez un chien femelle et cultivé « in vitro ». Corpuscule de Barr. (× 1500).

— 38 : Rate du Chien cultivée « in vitro » et inoculée avec un filtrat de tumeur de Sticker. Tumeur développée après inoculation de la culture cellulaire au chien donneur de la rate. Image de réticulo-sarcome. (× 600).

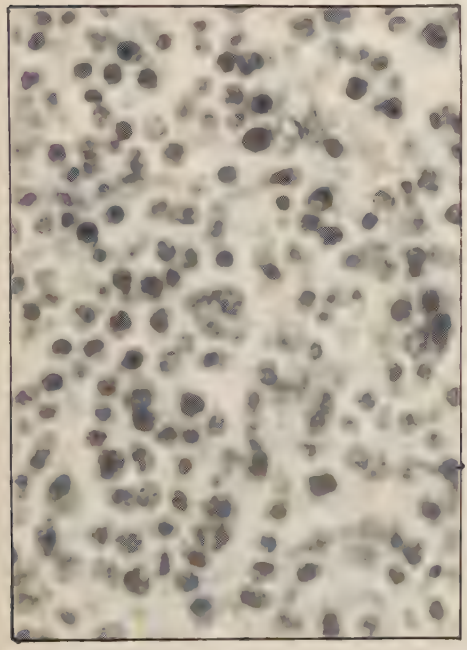
— 39 : Tumeur induite par inoculation au Chien de l'acide ribonucléique extrait du sarcome de Sticker.
Image de réticulo-sarcome. (× 600).

— 40 : Même tumeur. (× 1500).

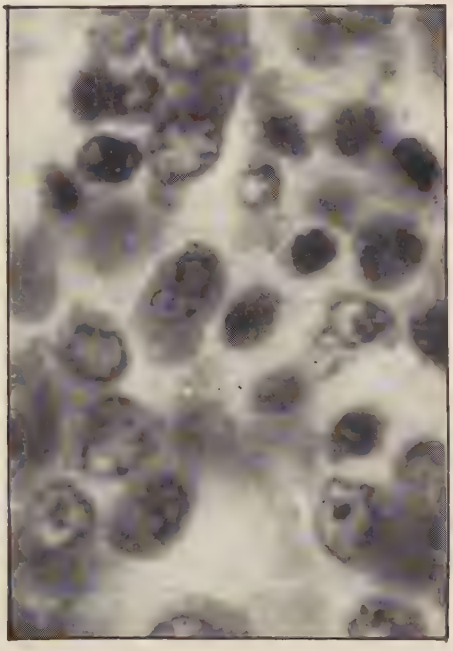
37



38



39



40

Figure 41 : Réticulo-sarcome cutané.
Chien 1848. Tumeur de l'épaule.

— 42 : Réticulo-sarcome cutané.
Chien 2034. Tumeur de la lèvre.

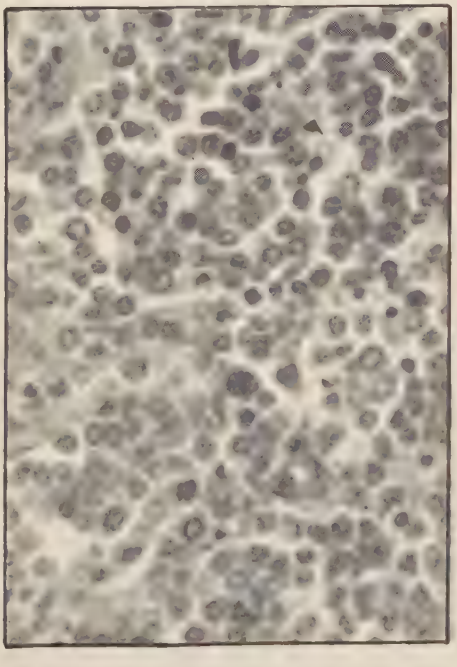
— 43 : Réticulo-sarcome cutané.
Chien 1838. Métastases cutanées nodulaires sur l'épaule et le nez.

— 44 : Réticulo-sarcome cutané.
Chien 1848. Tumeur de l'épaule. Histologie. (× 480).

41

42

43



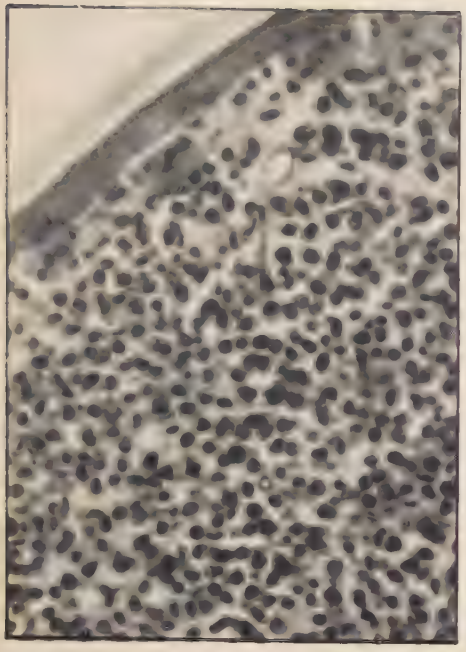
44

Figure 45 : Réticulo-sarcome cutané.
Chien 1848. Métastase nodulaire cutanée. Histologie (× 300).

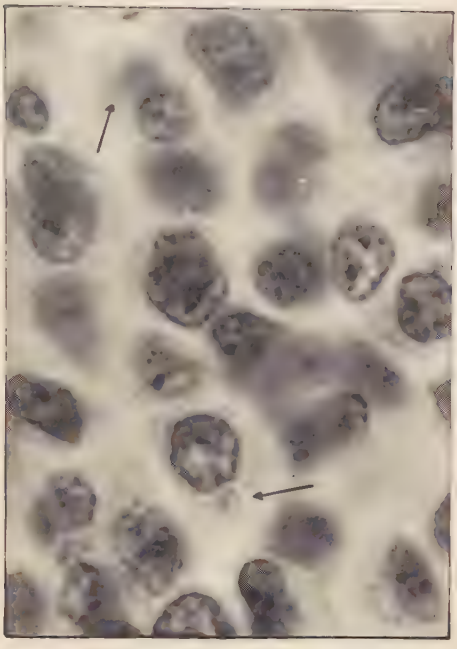
— 46 : Réticulo-sarcome cutané.
Chien 1848. Métastase cutanée. Corps d'inclusion éosinophile. (Hémalun-éosine). (× 1500).

— 47 : Réticulo-sarcome cutané.
Même tumeur. Corps d'inclusion basophile. (Dominici). (× 1500).

— 48 : Réticulo-sarcome cutané.
Chien 1838. Tumeur de l'épaule.. Empreinte. Giemsa.
Image de cellules réticulaires. (× 1500).

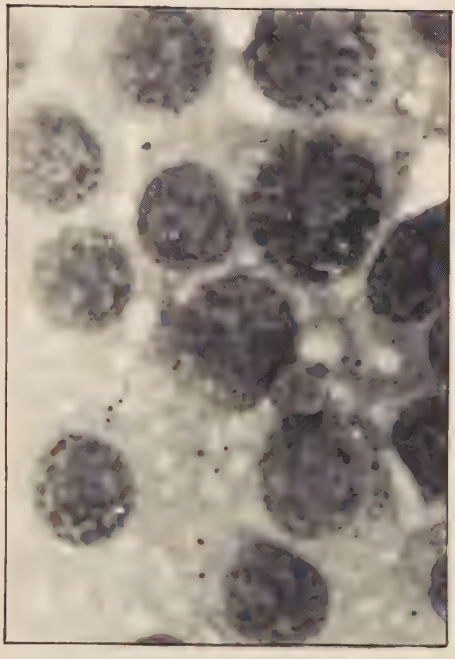


45



46

47



48

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

« La Chromatine sexuelle chez les mammifères »

Vu et approuvé :

Paris, le 22 MARS 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu, et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
J. ROCHE

AGEMP